

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

**Mitokondriaalse DNA stress põhjustab metabolismi muutusi *Drosophila melanogaster*'is läbi valkude atsetülatsiooni defekti**

Magistritöö (30 EAP)

Biomeditsiin

Diana Bahhir

Juhendaja: dotsent Priit Jõers

TARTU 2019

## **Mitokondriaalse DNA stress põhjustab metabolismi muutusi *Drosophila melanogaster*'is läbi valkude atsetülatsiooni defekti**

Mitokondrid on peamiselt ATP sünteesi kohtadeks spetsialiseerunud organellid rakus, kuid neil on ka palju teisi metabolismi ja organismide homöostaasi reguleerivaid funktsioone. Konventsionaalne ettekujutus mitokondriaalsete haiguste tekkepõhjustest omistab põhitähtsuse häiretele hingamisahelas, mis omakorda põhjustavad reaktiivsete hapnikuühendite (ROS-de) üleproduktiooni ning ATP sünteesi efektiivsuse langust. Kuid viimasel ajal oli leitud, et mitokondri düsfunktsioon võib põhjustada metaboolset ümberprogrammeerumist ilma märgatava efektita hingamisahelale. Käesoleva magistritöö teema baseerub varajasemalt meie töörühmas näidatud fenomenile, millel kohaselt mitokondriaalne DNA stress viib metaboolsete muutusteni *Drosophila melanogaster* mudelsüsteemis, kuid ei põhjusta hingamisahela defekti. Minu tulemused kirjeldavad uudset seost mtDNA stabiilsuse ja globaalse metabolismi vahel.

**CERCS teaduseriala:** P320 nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees; P310 proteiinid, ensümolooogia; B220 geneetika, tsütogeneetika.

Märksõnad: *Drosophila*, mitokondrid, mtDNA stress, mitokondriaalsed haigused, diabeet, rasvumine

## **Mitochondrial DNA stress causes metabolic changes in *Drosophila melanogaster* through protein acetylation defect**

Mitochondria are organelles specializing primarily in the synthesis of ATP through OXPHOS, but they also have numerous other functions in cell's metabolism. According to common presumption, respiratory chain dysfunctions are main causes of mitochondrial diseases, which in turn can lead to overproduction of reactive oxygen species (ROS) and the reduction in synthesis efficiency of ATP. However, recently it has been found that mitochondrial dysfunction can cause metabolic reprogramming without having a noticeable effect on the respiratory chain. The topic of this master's thesis is based on the previous finding of our workgroup, where the mitochondrial DNA stress leads to metabolic changes in *Drosophila melanogaster* model system, but does not lead to ROS production. The results demonstrate a novel link between stability of mtDNA and global metabolism.

**CERCS research specialization:** P320 nucleic acids, protein synthesis; P310 proteins, enzymology; B220 genetics, cytogenetics

Keywords: *Drosophila*, mitochondria, mtDNA stress, mitochondrial diseases, diabetes, obesity

# SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>8</b>
1.1 Mitokondri struktuur .....	8
1.2 Mitokondri funktsioonid.....	10
1.3 mtDNA ja nukleoidid .....	12
1.4 Mitokondritega seotud patoloogiad .....	14
1.5 Mitokondri kui metabolismi regulaator .....	18
1.6 <i>Drosophila melanogaster</i> mudelorganismina .....	21
1.6.1 GAL4-UAS ekspressioonisüsteem .....	23
1.6.2 Transgeense mtDNA stressisüsteemi tutvustus .....	26
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>28</b>
2.1 Töö eesmärk .....	28
2.2 Materjal ja meetodika.....	28
2.2.1 <i>Drosophila</i> käitlemine, ristamine ja tüved .....	28
2.2.2 Kärbeeste eluea määramine.....	30
2.2.3 Western blot.....	31
2.2.4 Triatsüülglütseriidide mõõtmine .....	32
2.2.5 Bradford.....	33
2.2.6 Kompleks II aktiivsuse mõõtmine.....	34
2.2.7 Mitokondriaalse fraktsiooni puhastamise meetodika .....	34
2.2.8 Statistiline analüüs .....	34
2.3 Tulemused ja arutelu .....	35
<b>KOKKUVÕTTE.....</b>	<b>43</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>45</b>
<b>TÄNUAVALDUSED.....</b>	<b>47</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>48</b>

<b>LISAD.....</b>	<b>60</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>62</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

**2OG** – 2-oksoglutaraat (ingl.k. *2-oxoglutarate*)

**4-AAP** – 4-aminoantipüriin (ingl.k. *4-aminoantipyrine*)

**AcCoA** – atsetüül koensüüm A molekul (ingl.k. *acetyl coenzyme A*)

**AGE** – glükatsiooni lõpp-produktid (ingl.k. *advanced glycation end products*)

**ATP** – adensiin trifosfaat (ingl.k. *adenosine triphosphate*)

**CoA** – koensüüm A (ingl.k. *coenzyme A*)

**DAP** – dihidroksüatsetoon fosfaat (ingl.k. *Dihydroxy Acetone Phosphate*)

**DM** – diabeet (ingl.k. *diabetes mellitus*)

**Drp1** – (ingl.k. *dynammin-related protein-1*)

**ECL** – võimendatud kemoluminestsents (ingl.k. *enhanced chemiluminescence*)

**ESPA** – naatrium N-etüül-N-(3-sulfopropüül) anisidiin (ingl.k. *N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidine sodium salt*)

**ETC** – elektronide transportahel (ingl.k. *electron transport chain*)

**FAD** – flaviin adeniin dinukleotiid (ingl.k. *flavin adenine dinucleotide*)

**Fis1** – mitokondriaalse fissiooni valk 1 (ingl.k. *mitochondrial fission 1 protein*)

**G-1-P** – glütserool-1-fosfaat (ingl.k. *glycerol 1 phosphate*)

**GK** – glütserooli kinaas (ingl.k. *glycerol kinase*)

**GPO** – glütserooli fosfaat oksüdaas (ingl.k. *glycerol-3-phosphate oxidase*)

**GTP** – guansiintrifosfaat (ingl.k. *guanosine triphosphate*)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – vesinikperoksiid (ingl.k. *Hydrogen peroxide*)

**HMG-box** – (ingl.k. *high mobility-group box*)

**KSS** – Kearns-Sayre sündroom (ingl.k. *Kearns-Sayre syndrom*)

**L1, L2, L3** – vastse staadiumid (ingl.k. *larval stages*)

**LHON** – Leberi päritav optiline neuropaatia (ingl.k. *Leber's hereditary optic neuropathy*)

**MELAS** – infarkti-sarnaste episoodid (ingl.k. *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*)

**MERRF** – müokloonus-epilepsia koos punaste narmendavate lihaskiududega (ingl.k. *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*)

**MFN1/2** – mitofusiinid 1 ja 2 (ingl.k. *mitofusin 1 and 2*)

**MP** – RU486 ehk mifepristoon (ingl.k. *mifepristone*)

**mtDNA** – mitokondrionaalne DNA (ingl.k. *mitochondrial DNA*)

**mtSSB** – mitokondriaalne üheaheelalist DNA-d siduv valk (ingl.k. *mitochondrial single-stranded DNA binding protein*)

**mtTFB** – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B (ingl.k. *mitochondrial transcription factor B*)

**NAD** – nikotiinamiid adeniin dinukleotiid (ingl.k. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NADPH** – nikotiinamiid adeniin- dinukleotiid fosfaat (ingl.k. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

**OTC** – ornitiin transkarbamülaas (ingl.k. *ornithine transcarbamylase*)

**OXPHOS** – oksüdatiivne fosforüleerimine (ingl.k. *oxidative phosphorylation*)

**PDC** – püruvaadi dehüdrogenaasi kompleks (ingl.k. *pyruvate dehydrogenase complex*)

**PEPCK** – fosfoenoolpüruvaadi karboksükinaas (ingl.k. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

**PHD** – proliülhüdrosülaas (ingl.k. *prolyl hydroxylase domain*)

**POD** – peroksüdaas (ingl.k. *peroxidase*)

**POLG** – (ingl.k. *mtDNA polymerase gamma*)

**POLRMT** – (ingl.k. *mtRNA polymerase*)

**RC** – hingamisahel (ingl.k. *respiratory chain*)

**ROS** – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl.k. *reactive oxygen species*)

**SDH** – suktsinaadi dehüdrogenaasid (ingl.k. *succinate dehydrogenase*)

**SIRT** – sirtuiin (ingl.k. *sirtuin*)

**SuccCoA** – suktsinüül koensüüm A molekul (ingl.k. *succinyl-coenzyme A*)

**TAG** – triatsüülglütseriid (ingl.k. *triacylglyceride*)

**TCA** – tsitraaditsükkel (ingl.k. *tricarboxylic acid cycle*)

**TFAM** – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A (ingl.k. *mitochondrial transcription factor A*)

**TIM** – eellasvalgu sisemembraanis asuv translokaas (ingl.k. *translocase of the inner mitochondrial membrane*)

**TOM** – eellasvalgu välimembraanis asuv translokaas (ingl.k. *translocase of the outer mitochondrial membrane*)

**UAS** – ülesvoolu aktiveeriv järjestus (ingl.k. *upstream activation sequence*)

## SISSEJUHATUS

Mitokondrid on eukarüootsete rakkude ühed suurimad organellid, mis mängivad organismi funktsioonide reguleerimisel olulist rolli. Üks peamisi ja paremini tuntuid funktsioone on adenosiin trifosfaadi (ATP) tootmine oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS) kaudu (Kühlbrandt, 2015), mis toimub mitokondri sisemembraani väljasopistustes ehk kristades ja mis viiakse läbi mitokondriaalse hingamisahela (RC) ja ATP süntaasi poolt (Alberts jt., 2002). Lisaks osalevad mitokondrid teistes tähtsates protsessides nagu apoptoosi indutseerimisel, raku ainevahetuse reguleerimisel, hormonaalses signalisatsioonis, signaaliülekandes mitokondriaalsete reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) kaudu jne (Frezza, 2017; Turrens, 2003).

Klassikalise ettekujutise järgi on mitokondriaalsete patoloogiate tekkepõhjuseks häired hingamisahelas, mis võivad omakorda põhjustada reaktiivsete hapnikuühendite (ROS-de) suurenenud produktsiooni ning ATP sünteesi efektiivsuse langust (Suomalainen ja Battersby, 2018). Siiski on viimasel ajal lisandunud tõendeid selle kohta, et mitokondri düsfunktsioon (näit. mitokondriaalse DNA ehk mtDNA ebastabiilsuse teke) võib põhjustada metaboolset ümberprogrammeerumist ilma omamata tugevat toimet hingamisahelale (Nikkanen 2016, Quiros jt., 2017). Seega on võimalik, et mitokondriaalsed defektid viivad patoloogiliste seisunditeni läbi mitmesuguseid metaboolsete ümberkorralduste, mis ei ole otseselt seotud hingamisahela düsfunktsiooniga (Suomalainen ja Battersby, 2018).

Käesoleva magistritöö teoreetilise osa eesmärk on anda lühiülevaade mitokondri struktuurist ja funktsioonidest, mitokondriaalsetest haigustest, mitokondri võimaliku rolli kohta globaalse metabolismi regulatsioonil ning kirjeldada meie uurimisgrupi andmeid, mis viisid antud töö teemani. Eksperimentaalse osa ülesandeks on uurida, kas mitokondri metabolism on muutunud vastusena süsivesikute tarbimise inhibitsioonile kompleks II näitel ning millise fenomeni kaudu inhibeerib mtEcoBI süsivesikute tarbimist lisaks Akt inhibitsioonile, kasutades selleks *Drosophila melanogaster*'i mudleorganismis konstrueeritud indutseeritavat mtDNA stressi süsteemi.

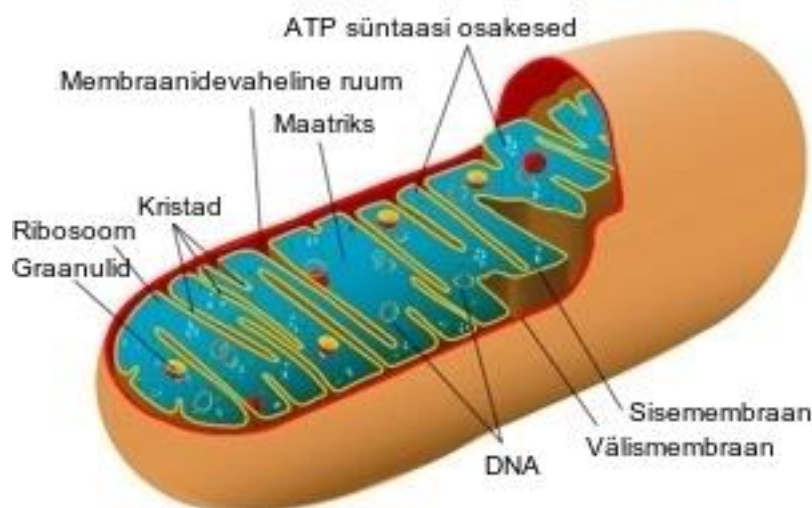
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Mitokondri struktuur

Mitokonder on eukariootse raku kahekihilise membraaniga ümbritsetud organell, millel on oluline roll organismi funktsioonide reguleerimisel. Mitokonder on eelkõige tuntud kui peamine ATP tootmise koht rakus OXPHOS kaudu. (Kühlbrandt, 2015). Lisaks sellele osaleb mitokonder ka mitmetes teistes protsessides nagu apoptoosi indutseerimine, rakulise metabolismi reguleerimine läbi metaboliitide (näit. ROS), tsitraaditsükli (TCA) vaheühendid) taseme modulatsiooni kaudu ning hormonaalsel signalisatsioonil (Alberts jt., 2002; Tymoczko jt., 2011; Frezza, 2017; Turrens, 2003).

Mitokondri koosneb sise- ja välismembraanist, mille vahele jääb membraanidevaheline ruum (Cooper, 2000). Välismembraan sisaldab palju transpordivalgu (poriini), mille tulemusena suudavad valgud molekulmassiga kuni 6 kD ja enamus metaboliite (v.a. väga suured nagu näiteks pika ahelaga rasvhapped) vabalt difundeeruda läbi välismembraani membraanidevahelisesse ruumi (Kühlbrandt, 2015), mis on seetõttu väikeste molekulide suhtes ekvivalentne tsütoplasma. Enamike valkude liikumine mitokondrisse vajab aktiivset transporti, mis algab välismembraanis paiknevate TOM komplekside kaudu. Viimased vastutavad valkude transpordi eest ja on enamasti tihedas kontaktis analoogsete TIM kompleksidega sisemembraanis (Muro jt., 2003). Kuna molekulide liikumine üle sisemembraani on aga väga palju selektiivsem kui läbi välismembraani, sisaldab maatriks kindlat selekteeritud molekulide komplekti. Sisemembraan on pindalalt välismembraanist oluliselt suurem ja omab seetõttu omapärast, kurrulist struktuuri, mille tulemusena voltub ta väljasopistusteks e. kristadeks (vt. Joonis 1). See on seotud ATP produktsiooniks vajaliku prootongradienti genereerimisega üle sisemembraani, mistõttu on ATP tootmise võime otseses seoses sisemembraani pindala suurusega (vt. „Mitokondri funktsioonid“). Sisemembraani sisse jäävat piirkonda nimetatakse maatriksiks, mis on enamike mitokondris toimuvate biokeemiliste reaktsioonide (v.a. OXPHOS) toimumispaigaks. Seega on kõikidel mitokondri struktuuri komponentidel oma peamised funktsionaalsed rollid, kuid maatriksis ja sisemembraanis toimub enamik mitokondriga seostatavaid ensüümide poolt katalüüsitud reaktsioone nagu TCA tsükkel, OXPHOS ja mitmed teised anaboolsed/kataboolsed metabolismirajad (Cooper, 2000; Alberts jt., 2002; Tymoczko jt., 2011).





**Joonis 1. Mitokondri struktuur.** Pildil on näidatud sisemembraan, välismembraan ning maatriks, kus asub mtDNA ja mitokondriaalsed ribosoomid. Joonis pärineb <https://www.cs.mcgill.ca/~rwest/wikispeedia/wpcd/wp/m/Mitochondrion.htm>

Vastupidiselt tihti esinevale eksiarvamusele mitokondritest kui jäikadest, staatilistest struktuuridest, eksisteerivad mitokondrid rakus dünaamilises võrgustikus, mille eraldiseisvad osad on pidevas liitumis- ja lahknemisprotsessis. See võimaldab mitokondriaalsete komponentide liikumist erinevate võrgustiku osade vahel ning mitokondriaalse võrgustiku suuruse, arvu ja morfoloogia reguleerimist. Lahknemis- ja liitumisprotsessid on samuti olulised õige mitokondriaalse membraani potentsiaali säilitamiseks funktsioneerivates organellides (Scott ja Youle 2010; Youle ja Van Der Bliek, 2012). Membraani potentsiaali vähenemist peetakse üheks peamiseks signaaliks, mille alusel elimineerib rakk mittefunktsionaalseid mitokondriaalse võrgustiku osi läbi mitofaagia (Chan, 2006; Youle ja Van Der Bliek, 2012). Seetõttu koondades defektsed mitokondri osised ühte võrgustiku osasse, saab auto- või mitofaagia abil tagada ebanormaalselt funktsioneerivate mitokondriaalsete komponentide elimineerimise. Mitokondriaalne liitumine on kompleksne protsess, mis nõuab sisemise ja välimise mitokondriaalse membraani liitumise koordineerimist. Mitokondriaalse välismembraani fusiooni vahendavad mitofusiinid 1 ja 2 (MFN1 ja MFN2), mis toimivad nii individuaalselt kui ka kooperatiivselt tagamaks soovitud liitumisastme saavutamist (Chen jt., 2003), samas kui OPA1 on sisemise mitokondriaalse membraani liitumise põhikomponent. (Escobar-Henriques ja Anton, 2012). Mitokondriaalse lahknemisprotsessi reguleerib dünaamiiniga seotud GTPaas, Drp1, mis mitokondrites seotud välismembraanil asuva valguga, Fis1 (Westermann, 2012; Meyer jt., 2017).

## 1.2 Mitokondri funktsioonid

Mitokondri sisemine kompartmentaliseeritus on tihedas seoses kesksete metabolismiradade toimimisega. Mitokondri maatriksis toimub enamus anabolismiga seotud reaktsioone ning keskne katabolismirada TCA tsükkel, mille käigus süsivesikute ja/või rasvhapete lagundamisel ekstraheeritud elektrone transporditakse sisemembraanis hingamisahelale (RC). See algab aktiveeritud kandja atsetüül koensüüm A (AcCoA) genereerimisega vastavalt kas püruvaadi konverteerimisel püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi (PDC) poolt süsivesikute katabolismil või rasvhapete beeta-oksüdatsiooni tulemusena. AcCoA siseneb tsitraaditsükli, kus oksaloatsetaadiga kondenseerumise tulemusena tekib kuuesüsinikuline tsitraat. Edasiste dekarboksülatsioonide tulemusena eraldub kaks CO<sub>2</sub> molekuli ning tekib neljast süsinikust koosnev suksinüül-CoA. See konverteerub järjestikuliste reaktsioonide tulemusena uuesti oksaloatsetaadiks, mis saab lülituda järgmisse tsükli kondenseerudes AcCoA-ga. Oksaloatsetaati saadakse ka malaadi oksüdeerimisel, aspartaadi deamineerimisel ja ka püruvaadi karboksüleerimisel (Alves jt., 2015). Tsitraaditsükli käigus tekivad CO<sub>2</sub> ja redutseeritakse elektronide kandjad NADH ja FADH<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> väljub rakust kui jääkaine, samas kui NADH ja FADH<sub>2</sub> transpordivad elektrone sisemembraanis paiknevale elektroni transpordi ahelale (Cooper 2000; Alberts jt., 2002). Enamik raku ATP-st sünteesitakse OXPHOS-I, mis viiakse läbi mitokondri sisemembraanis. Kõrge energiaga elektronid, mis transporditakse NADH ja FADH<sub>2</sub> poolt hingamisahelale, liiguvad piki hingamisahela ensüüme kuni kompleks IV-ni. Selle käigus vabanev energia kasutatakse ära prootonite pumpamiseks mitokondri maatriksist intermembraansesse ruumi. Selle tulemusena tekkiv prootonite gradient üle mitokondri sisemembraani genereeritakse kolme suure hingamisahela membraanvalgu kompleksite poolt - kompleks I (NADH/ubikvinoon oksüdo reduktaas), III (tsütokroom C reduktaas) ja IV (tsütokroom C oksüdaas). Kompleks I saab elektrone aktiveeritud kandjalt NADH-lt ning kannab need membraani koensüüm Q<sub>10</sub>-le, moodustades tema redutseeritud vormi ubikvinooli. Koensüümi Q<sub>10</sub> on hingamisahela lipofiilne komponent, mis toimib rakkudes nii elektronide kandjana I ja III vahel kui ka antioksidantina ning osaleb ka membraanide stabiliseerimisel (Chol jt., 2003). Elektronide ülekande reaktsioonis vabanevat energiat kasutatakse nelja prootoni pumpamiseks maatriksist IMS-i. Kompleks III aktsepteerib redutseeritud ubikvinoolist elektrone ja edastab neid tsütokroom C-le. Lõpuks kompleks IV kannab need neljakaupa molekulaarsele hapnikule, mille tulemusena tekib H<sub>2</sub>O. Kompleks II (suksinaadi dehüdrogenaas (SDH)) kannab elektronid suksinaadist otse Q<sub>10</sub>-le ja ei osale otseselt prootonigradiendi tekitamisel. Tsitraaditsükli toimub suksinaadi oksüdeerumine fumaraadiks kompleks II poolt ning tema kofaktor FAD redutseeritakse FADH<sub>2</sub>-ks, mille kaudu

jõuavad elektronid liikuva ubikvinooli molekulini ja sisenevad elektronide transpordi ahelasse. Selles kompleksis prootonite pumpamist ei toimu ja seetõttu ei saa  $\text{FADH}_2$ -st saadud elektronide liikumise arvelt ahelas toota sama palju ATP -d kui NADH puhul. (Kühlbrandt, 2015; Tymoczko jt., 2011). Teatud sagedusega toimub aga elektronide kõrvalekaldumine nn. ettenähtus teest piki hingamisahela komplekse. Sellisel juhul toimub elektronide ensümaatilisel mittekontrollitud liitumine kõrgeima redokspotentsiaaliga molekuliga (milleks on matriksis hapnik), mille tulemusena tekivad toksilised reaktiivsed hapnikuühendid (ROS) nagu hüdroksüülradikaal ( $\cdot\text{OH}$ ), vesinikperoksiid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ning superoksiid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). ROS-de primaarseks mitokondriaalseks vormiks on reaktiivne superoksiidi radikaal; kuid vesinikperoksiid on ainus ROS-de tüüp, mis on piisavalt vähereaktiivne, et läbida mitokondriaalset membraani ja võib levida rakus kaugemale. ROS-e tekib rakus ka väljaspool mitokondreid, näiteks plasmamembraanides ja peroksüsoomides, kuid enamasti on just mitokondrid ROS-de peamiseks allikaks (Wallace, 2005; Balaban jt., 2005; Sena ja Chandel, 2012). Kui elektronide liikumine toitainete oksüdeerimise käigus ületab OXPHOS-i võimekuse neid hapnikule kanda või on RC defektide tulemusena nende n.ö. „normaalne“ liikumine häiritud, võib elektronide kõrvalekalle oluliselt suurened. Teatud hulgal on ROS-ide tekkimine organismis normaalne ja isegi vajalik, kuna nad on vajalikud erinevates signaaliülekande radades (Suzukawa jt., 2000). Siiski on ROS-de üleproduktioon tugevalt negatiivse mõjuga, kahjustades mtDNA-d, tuuma DNA- d, lipiide ja valke; põhjustades organismi homöostaasi muutusi, mis omakorda tekitavad või halvendavaid erinevaid patoloogiaid (Balaban jt., 2005).

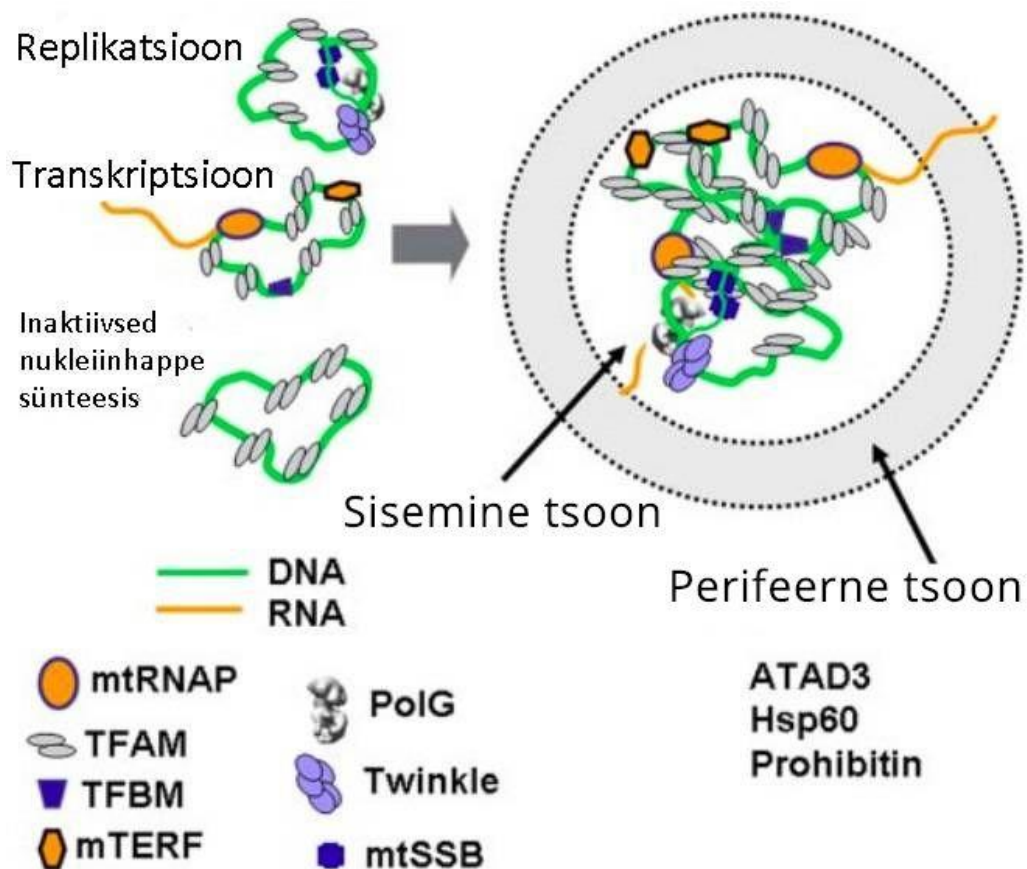
OXPHOS-I toodetakse ATP-d mitokondri membraanis asuva ATP süntaasi kompleksi abil, mis kasutab gradiendi energiat juhtides prootonid intermembraanses ruumist matriksisse ning energia salvestub ATP-sse keemilise energia kujul. Seega kujutab mitokondri sisemembraan endast ATP generatsiooni peamist asukohta ja see kriitilise tähendusega roll peegeldub ka tema struktuuris. Seetõttu on tema pindala oluliselt suurem välismembraanist tänu kristadele ning lisaks sisaldab sisemine mitokondriaalne membraan suurt kogust valke, mis on seotud nii oksüdatiivse fosforüülimisega kui ka metaboliitide (nt püruvaadi ja rasvhapete) transpordiga tsütosooli ja mitokondrite vahel (Berk jt., 2000; Cooper 2000; Alberts jt., 2002).

Lisaks eelpool mainitule on mitokondritel veel palju teisi funktsioone. Need erinevad reaktsioonid mängivad rolli aminohapete sünteesil, raku ioonilises homeostaasis, sealhulgas lämmastiku reguleerimises (Hutson jt., 2005; Medina, 2001) ja paljude bioloogiliselt aktiivsete ühendite sünteesis, nagu näiteks puriinid, püramidiinid, hormoonid jne. Steroidhormoone sünteesitakse koospetsiifiliste mitokondriaalsete ensüümide poolt. Kuus steroidhormoonide

klassi, mis on hädavajalikud imetajate elu jaoks, sünteesitakse kolesteroolist keeruliste biosünteesradade kaudu, millest osad etapid toimuvad mitokondris. Nende hormoonide hulka kuuluvad glükokortikoidid, mineralokortikoidid, östrogeenid, progestiinid, androgeenid ja kaltsiferoolid. Steroidogeenide kudede mitokondrites on kaks eripära – spetsiaalsed mehhanismid, mille abil kolesterool transporditakse mitokondritesse ja spetsialiseeritud intra-mitokondriaalsed ensüümid, mis osalevad hormonaalsete steroidide sünteesil (Miller, 2013).

### **1.3 mtDNA ja nukleoidid**

Mitokondriaalne DNA (mtDNA) on mitokondrites asuv rõngakujuline DNA-molekul. Inimese kaheahelaline mtDNA molekul on 16569 bp pikk ning sisaldab 37 geeni, millest kõik on olulised normaalse mitokondriaalse funktsiooni jaoks (Taanman, 1999). Nendest 13 kodeerivad valke, mis on kõik ETC komplekside ja ATP süntaasi subühikud ning vajalikud OXPHOS-i osalevate ensüümide valmistamiseks. Seetõttu kodeerib mtDNA lisaks ka täielikku komplekti translatsiooniks vajalikke RNA molekule (22 tRNA-d ja 2 rRNA-d) (Gilkerson jt., 2013; Taanman, 1999). Juhul kui kõik mtDNA koopiad on rakus identsed, sellisel juhul on tegemist homoplasmiaga. Heteroplasma puhul esineb rakus üheaegselt nii metsiktüüpi kui ka mutantseid mtDNA järjestusi (Stewart ja Chinnery, 2015). Kuigi mtDNA arv raku kohta võib tugevalt kõikuda olenevalt koe tüübist, esineb neid tavaliselt tuhandetes eksemplarides ja nad on pakitud valk-DNA kompleksidesse, mida nimetatakse mitokondriaalseks nukleoidiks (Gilkerson jt., 2013). Kuigi nukleoidide koostis ja struktuur ei ole kaugeltki selge, prevaleerib ettekujutus, mille järgi nukleoidi makromolekulaarne struktuur koosneb mtDNA-ga seotud valkudest ja perifeersest tsoonist (vt. Joonis 2).



**Joonis 2. MtDNA nukleoidi struktuuri mudel.** Nukleoidis mõned üksikud mtDNA molekulid võivad osaleda replikatsioonis, transkriptsioonis või olla inaktiivsed nukleiinhappe sünteesis. Joonis on kohandatud artiklist Bogenhagen jt., 2008

Nukleoidiga seotuid valke erinevatest organismidest võib klassifitseerida vähemalt nelja rühma: (1) teadaolevate funktsioonidega DNA transaktsioonide ja pakendamisega seotud valgud, (2) valkude kvaliteedikontrollis osalevad faktorid, (3) erinevate toimetega bifunktsionaalsed metaboolsed ensüümid, ja (4) tsütoskeleti komponendid. Nukleoidide nn. „sisemise tsooni“ kesksed komponendid on enamasti valgud, mis osalevad mtDNA pakkumisel, transkriptsioonis ja replikatsioonis, nagu mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A (TFAM), mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d siduv valk (mtSSB), POLG ja mtRNA polümeraas (POLRMT), mida leidub nii ristseotud kui ka natiivsetes HeLa rakkude nukleoidfraktsioonides (Bogenhagen jt., 2008). Sõltuvalt eraldamise meetodikast varieerub nukleoidide valguline komponent tugevalt, mistõttu pole ühtset konsensust enamike komponentide suhtes (Hensen jt., 2014). Erandiks on TFAM, mille universaalne esinemine kõikides nukleoidides on üldiselt aktsepteeritud. TFAM on 24 kDa valk, mida peale osalemise mitokondriaalse transkriptsiooni regulatsioonis (Fisher ja Clayton, 1985) peetakse ka peamiseks mtDNA pakkimisel osalevaks faktoriks (Alam jt., 2003). TFAM-i struktuuris on kaks *high-mobility* rühma (HMG) – *box* domeeni, mille abil luuakse kontakt mtDNA-ga ja

vahendatakse pakkumist. TFAM pakendab DNA-d *in vitro* (Kaufman jt., 2007) ja kolokaliseerub nukleodides koos mtDNA-ga (Iborra jt., 2004; Legros jt., 2004). Lisaks TFAM-le peetakse nukleodides kõige sagedamini esinevateks valkudeks veel nn. tuumikfaktoreid nagu POLG2, mtSSB ja DNA helikaas Twinkle, mis on vajalikud mitokondriaalse replikatsiooni jaoks, samas kui POLRMT ja mtTFB on olulised mitokondriaalse transkriptsiooni jaoks. Lisaks TFAM-le on näidatud teatud tuumikfaktorite nagu POLGb subühiku ja CSB faktori roll nukleoidi struktuuri organiseerumises (Di Re jt., 2009; Berquist jt., 2012; Bogenhagen, 2012). Peale nende faktorite on nukleoidide valgulise komponendi koostises ( $\geq 50$  valgu enamiku uuritud rakutüüpide puhul) ka hulgaliselt valke millede funktsioon ja roll nukleodides on teadmata. Lisaks tuumikfaktoritele sisaldab nukleoid varieeruvat komplekti perifeerseid faktoreid, mis kontrollivad mitokondriaalset biogeneesi, metabolismi (näit. fosfoenoolpüruvaadi karboksükinaasi isovorm 2 (PEPCK2) mis on glükoneogeneesi kiirust limiteeriv ensüüm), apoptoosi ja retrograadset mitokondrit tuumaga ühendavat signalisatsiooni. Seega on mitmetel nukleoidiga seotud valkudel teadaolev funktsioon erinevate metabolismiradade katalüüsil, kuid mis ei ole otseselt seotud mtDNA pakkimise, replikatsiooni ja transkriptsiooniga. See omakorda viitab võimalusele, et läbi selliste bifunktsionaalsete komponentide võib mtDNA ja nukleoidide stabiilsus mõjutada globaalset metabolismi. Praeguseks on kirjeldatud vaid ühte juhtumit, kus nukleoidi struktuuri muutustest tulenevalt reguleeritakse üldist metabolismi läbi nukleoidis esineva akonitaasi (Chen jt., 2005), teistes organismides peale hariliku pagaripärmi ei ole siiani sellist fenomeni kirjeldatud (Gilkerson jt., 2013).

#### **1.4 Mitokondritega seotud patoloogiad**

Mitokondriaalsed haigused on mitokondri funktsiooni häiretest tulenevad geneetilised haigused, mis on põhjustatud mutatsioonidest kas mtDNA-s või tuuma DNA geenides, mille produktid transporditakse mitokondrisse, kus nad osalevad OXPHOS-i valkkomplekside assambleerumisel, funktsioneerimisel ja degradatsioonil ning mtDNAGA seotud funktsioonide läbiviimisel. (Suomalainen ja Battersby, 2018). Viimasel juhul võivad nad tekitada nn. sekundaarseid mutatsioone mtDNA-s, milleks on enamasti deletsioonid.

Mitokondriaalsed haigused, mis on põhjustatud mtDNA mutatsioonide poolt kanduvad edasi emadelt järglastele tänu mtDNA emapärilikkusele. Nad võivad esineda kas mitokondriaalsetes valgu-, tRNA- või rRNA-geenides, kuid enamik (rohkem kui pooled) haigusi põhjustavaid

punktmutatsioone esineb mt-tRNA geenide sees (Schaefer jt., 2008). Muutused mitokondriaalses geneetilises koodis mõjutavad kas otseselt spetsiifiliste ETC komplekside komponentide funktsioneerimist (valke kodeerivad geenid) või kahjustavad üldist mitokondri translatsiooni mehhanismi (mutatsioonid tRNA geenides). On leitud, et patogeensed punktmutatsioonid mtDNA valke kodeerivates geenides võivad põhjustada laialdaste sümptomitega multisüsteemseid häireid, sh. mitokondriaalse entsefalomüopaatia sündroomi, laktatsidoosi ja infarkti-sarnaste episoodide (MELAS), müokloonus-epilepsiat koos punaste narmendavate lihaskiududega (MERRF), Leighi sündroomi ja Leberi päritavat optilist neuropaatiat (LHON) (Wu jt., 2010; Russell ja Turnbull, 2014). Leighi sündroomi sümptomiteks on vaimse ja liikumisvõime progresseeruv kadu (nn psühhomotoorne regressioon) ja tavaliselt Leigh sündroomiga haiged surevad 2-3 aasta jooksul hingamispuudulikkuse tõttu. Sündroomi põhjustavad mutatsioonid on leitud umbes 80 erinevas geenis. Nii Leigh kui ka Leigh-sarnast sündroomi põhjustavad hingamisahela komplekside (eriti komplekside I, II, IV või V), koensüümi Q<sub>10</sub> (ubikvinoon) sünteesiraja defektsus või püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi defektid. Kõige tavalisemad punktmutatsioonid on nukleotiidi positsioonis 8344 A→G tRNA<sup>Lys</sup> geenis ja heteroplasmiline 3243 A→G transitsioon tRNA<sup>Leu</sup> geenis mitokondriaalses genoomis, nende sagedus tavapopulatsioonis on 1:400. (Manwaring jt., 2007). On teada, et punktmutatsioon nukleotiidi positsioonis 8344 (A→G) põhjustab 80-90% kõigist teadaolevatest MERRF-i juhtudest (Wu jt., 2010). Naha fibroblastides läbi viidud uuringud on näidanud tugevat korrelatsiooni 8344 (A→G) ja OXPHOS-ahela I ja IV kompleksi vähendatud funktsiooni vahel, mis tähendab seda, et selle mutatsiooniga isikutel on seega palju madalam ATP-produktsioon ning seega organite düsfunktsioon, kus kudedel on kõrge energianõudlus (James jt., 1996).

Laiaulatuslikud deletsioonide tekkimise tulemusena kaob osa mitokondriaalsest genoomist, põhjustades mitmete valkude kodeerivate geenide üheaegset kadumist. (Campbell, 2014). Laiaulatuslikkude deletsioonide suurused ja asukohad võivad varieeruda (Pitceathly jt., 2012). Mitmesuguse pikkusega mtDNA deletsioonide esinemine on eelkõige põhjustatud mutatsioonidest tuuma geenides, mille produktid tegelevad mtDNA säilitamise ja replikatsiooniga ja mitokondriaalsete nukleotiidide metabolismiga (Hudson ja Chinnery, 2006; Spelbrink jt., 2001). Samuti oli leitud mitmete mtDNA deletsioonide akumulatsiooni vanades postmitootilistes kudedes ja neurodegeneratiivsete haigustega isikutel (Cortopassi jt., 1992; Kraytsberg jt., 2006). Juhul, kui et mtDNA deletsioonid tekivad arengu alguses, siis levib antud deletsioon klonaalse paljunemise tulemusena kõikides kahjustatud kudede rakkudes (Chen jt., 1995). Deletsiooni käigus eemaldatakse erinev arv olulisi valgu kodeerivaid alamühikuid

komplekside I, III, IV ja V jaoks ning tRNA-d kodeerivaid geene, mis on vajalikud mtDNA-kodeerivate OXPHOS-komplekside translatsiooniks, mille tulemusena tekib düsfunktsioon OXPHOS-is (Pitceathly jt., 2012; Tuppen jt., 2010). MtDNA deletsioonidest põhjustatud haiguste hulka kuuluvad Pearsoni luuüdi-pankreas-sündroom, mis on haruldane imikuea haigus, kus luuüdi tüvirakkude jagunemine on takistatud; Kearns-Sayre sündroom (KSS), mis on lapsepõlves ja noorukieas esinev multisüsteemne haigus; ja krooniline progresseeruv oftalmopleegia, mis kahjustab kõige sagedamini silmaliigutajalihaseid. Hiljutine vaatlus näitas, et nii mtDNA deletsiooni suurus kui ka heteroplasma tase omavad olulist rolli haiguse fenotüübi ja kliinilise progressiooni määramisel ning tõstab esile olulise seose biokeemilise defektiga (Russell ja Turnbull, 2014). Kuna tegemist on raskete, tihtipeale surmaga lõppevate haigustega, on mitokondriaalse DNA (mtDNA) säilitamiseks vajalike valkude defektid pälvinud olulist tähelepanu meditsiinilises geneetikas ja molekulaarbioloogias. Sellele haigusrühmale on iseloomulik mtDNA progresseeruv kadu ja/või mitmete mtDNA deletsioonide (Moraes jt., 1991) somaatiline akumulatsioon. Hetkel on aga ebaselge, millised mehhanismid kontrollivad nend deletsioonide püsijäämist ning ekspansiooni kiirust, mis võib varieeruda väga tugevalt erinevate patoloogia tüüpide ja patsientide vahel. Mitokondriaalse replikatiivse DNA polümeraasi  $\gamma$  (POLG) defektid põhjustavad mitmesuguseid neuroloogilisi haigusi - progressiivne välimine oftalmopleegia (PEO), Alperi sündroom ja parkinsonism (Van Goethem jt., 2001). Lisaks sellele, *mutator*-hiirtel, kes ekspresseerivad defektse korrektsoonimehhanismiga POLG versiooni, oli suurtes kogustes mtDNA punktmutatsioone ja vananemisega seotuid sümptome (Trifunovic jt., 2004). See toetab mtDNA mutatsioonide (siiani küll hüpoteetilist) rolli vananemise protsessil (Trifunovic jt., 2004). On näidatud, et välimise oftalmopleegia võib olla põhjustatud lisaks POLG defektidele ka muteerunud Twinkle geeni poolt koos mitmete mtDNA deletsioonidega. Haigus avaldub müopaatiana, mis sageli mõjutab ekstraokulaarseid, jäsme- ja näolihaseid, millega mõnikord kaasnes kliiniline depressioon (Lewis jt., 2002). *In vitro* on näidatud, et Twinkle geeni produkt moodustab minimaalse mtDNA replisoomi koos mitokondriaalse üheaheelalise DNA-siduva valgu ja POLG-ga (Korhonen jt., 2004), tõestades selle valgu rolli mt replikatsiooni peamist helikaasina. Seda rõhutab ka fakt, et Twinkle puudusel toimus kiire intaktse mtDNA kadu ja kuhjusid replikatsiooni vahevormid rakukultuuris (Goffart jt., 2008). Taoline mtDNA ebastabiilsus põhjustab mtDNA aberrantseid ümberkorraldusi ja viis dominantset Twinkle mutatsiooni ekspresseerivas hiireliinis mtDNA deletsioonide kuhjumisele (nn. *deletor*-hiir) (Tyynismaa jt., 2005).



Klassikalise ettekujutise järgi on mitokondriaalsete patoloogiate tekkepõhjusteks häired hingamisahelas ja mis võivad omakorda põhjustada ROS-de suurenunud produktsiooni ning ATP sünteesi efektiivsuse langust (Suomalainen ja Battersby, 2018). Nagu eelpool mainitud, on suurtes kogustes vabad hapniku radikaalid rakule toksilised, kahjustades membraanilipiide, nukleiinhappeid ja valke (Balaban jt., 2005; Turrens, 2003). Kuid juba aastakümneid tagasi on täheldatud mitokondriaalsete haiguste fenotüüpide hämmastavalt suurt heterogeensust, mille tulemusena on nende patoloogiate kliiniline pilt on väga mitmekesine. Esiteks, mitokondriaalne haigus võib ilmned nii neonataalses perioodis, kui ka lapsepõlves ja täiskasvanueas. Teiseks, mitmed kliiniliselt identsed mitokondriaalsed sündroomid võivad olla põhjustatud erinevate mutatsioonide poolt, samas kui üks ja seesama mutatsioon võib põhjustada erinevaid patoloogiaid erinevates isikutes (Staiger jt., 2017; Tezze jt., 2017). See seab kahtluse alla lineaarse seose mitokondri patoloogiate ja ROS-de üleproduktsiooni/ATP vähenemise vahel. Kuigi antud fenomenid on kindlasti peamiste defektide põhjustajateks mitmetes hästikirjeldatutes mitokondriaalsetes patoloogiates, võib selline heterogeensus olla tingitud teiste mitokondri funktsiooniga seotud metabolism aspektide häiretest. Viimasel kümnendil on üha enam kogunenud seda hüpoteesi toetavat informatsiooni, nagu näiteks mitokondriaalsete düsfunktsiooni osalemine metabolism ümberkorraldustes endokriinse regulatsiooni kaudu läbi fibroblastide kasvufaktori 21 (FGF21). FGF21 on stressi-vastuse hormoon, mis reguleerib olulisi metaboolseid radasid läbi sekretsiooni mitmetest organitest ja mõju erinevatele kudedele (kõige rohkem FGF21 leidub maksas, kesknärvisüsteemis ja rasvakoes). On leitud, et mitokondriaalsete haiguste puhul on FGF21 tase tõusnud (Staiger jt., 2017; Tezze jt., 2017). Mitokondriaalsete haiguste imetajate mudelid nagu eelpool kirjeldatud *mutator*- ja *deletor*-hiired produtseerinud oluliselt rohkem FGF21-e (Ahlqvist, 2015). Huvitaval kombel on *deletor*-hiirtel omadus tarbida eelkõige rasvu oma katabolismil, mille tõttu on nad resistentsed kõrge rasvasisaldusega dieedi poolt põhjustatud rasvumise suhtes, kinnitades metaboolset soodsat sünergia mitokondriaalse stressi ja FGF21 vahel (Tezze jt., 2019; Gomez-Samano jt., 2017; Tyynismäe jt., 2010). Seost mitokondriaalne kahjustuste ja FGF21 elevatsiooni vahel on täheldatud ka inimestel - 405 kriitilise üldseisundiga patsiendi uuringus oli seerumi FGF21 kontsentratsioon 8 korda kõrgem kui kontrollimata isikutel (Tezze jt., 2019). Lisaks sellele leitud positiivsed FGF21 toimed metabolismile ja ravimite farmakokineetikale ja dünaamikale, nagu näiteks metformiini kasulike metaboolsete toimete soodustamine. FGF21 geeni promootoril on spetsiifilised DNA elemendid, mis aktiveeritakse transkriptsioonifaktori 4 (ATF4) poolt. Selle faktori poolt käivitatud stressivastust on samuti täheldatud mitmete indutseeritud mitokondriaalsete defektide korral ning seda peetakse üheks põhiliseks

mitokondriaalsete signaalide poolt käivitatud stressivastuse regulaatoriks (Gomez-Samano jt., 2017).

Selle faktori poolt indutseeritud nn. integreeritud stressivastuse poolt põhjustatud muutusi on palju ning üheks nende hulgas on ka seriini biosünteesi induktsioon (Ye jt., 2012, Bao jt., 2016). Lisaks oma rollile valgu sünteesis on seriin ka fosfolipiidide biosünteesi prekursor ja peamine ühesüsinikuliste ühendite (1C) metabolismi allikas. 1C metabolismirada toimub nii mitokondris kui ka tsütosoolis ning ATF4-st sõltuvat seriini üleproduktsooni on leitud mitmete mitokondriaalsete defektide puhul (Bao jt., 2016; Nikkanen, 2016; Tyynismaa jt., 2005; Quiros jt., 2017). Kuna hingamisahela blokaadile järgneb ATF4-sõltuv seriini sünteesi aktiveerimine (Ye jt., 2012), siis võib see tähendada, et taoline aktiveerimine võib-olla adaptiivne, aidates säilitada raku 1C kättesaadavust. Kuna 1C metabolismist sõltuvad mitmed elutähtsate ühendite ja raku komponentide sünteesirajad, on absoluutselt vajalik antud metabolismi jätkumine ka defektse hingamisahela tingimustes. Selline ootamatu seos seriini biosünteesi ja sellest sõltuva 1C metabolism ning mitokondriaalsete defektide vahel rõhutab seda, et kuigi ROS-de üleproduktsoon ja ATP sünteesi defekt kindlasti eksisteerivad mitokondriaalsete haiguste põhjustena, on üldpilt tõenäoliselt keerulisem ja kompleksem. Veel enam, teatud mitokondriaalsete häirete korral, mille puhul täheldati ATF4 kaudu indutseeritud seriini produktsiooni, ei tuvastatud ROS-de kuhjumist ega ATP sünteesi defekti (Quiros jt., 2017). See viitab aga sellele, et antud signaalid indutseeritakse mitokondris mehhanismide poolt, mis ei mõjuta RC-d ega OXPHOS-i.

### **1.5 Mitokonder kui metabolismi regulaator**

Nagu eelpool mainitud, koordineerivad mitokondrid mitmeid metaboolseid radu, mis produtseerivad rakkude elutegevuseks vajalikke metaboliite. Huvitaval kombel on üha rohkem andmeid selle kohta, et mitmetel mitokondriaalsetel metaboliitidel, eelkõige TCA vaheühenditel on duaalne roll: lisaks nende osalemisele ülalpool kirjeldatud kesksetele katabolismiradadel on neil ka olulised signaalfunktsioonid, seda eelkõige läbi epigeneetiliste ja posttranslatsiooniliste modifikatsioonide (PTM-de) kaudu (Frezza, 2017).

Üheks hästi tuntud näiteks mitokondriaalsete metaboliitide duaalsest rollist on AcCoA, mis osaleb nii kataboolsel kui ka anaboolsel metabolismil ja on lisaks ka veel peamine

atsetüüldoonor valkude atsetüleerimisel. Atsetüülatsioon on laiemas mõistes atsetüülrühma ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) lisamine orgaanilistele ühenditele ja selle lisamine lüsiini jäägile on üks peamisi PTM-de tüüpe. Algselt pakkus ta huvi eelkõige tänu histoonide atsetüleerimise tõttu – nimelt nende valkude lüsiini jääkide neutraliseerimisel läbi atsetüülrühmade lisamise on võimalik muuta kromatiini „avatuse“ astet ja seeläbi reguleerida geenide transkriptsiooni (Fan jt., 2015). Kuid praeguseks on atsetülatsiooni roll tublisti laienenud ning teadaolevalt on see üks põhilisi metaboolsete ensüümide regulatsiooni vorme. Lisaks histoonidele on atsetülatsioonil ka suur tähtsus peamiste metaboolsete radade regulatsioonil, moduleerides võtmeensüümid aktiivsust, seda nii mitokondriaalsete kui ka teiste valkude puhul. Seetõttu on atsetülatsioon oluline lisaks kromatiini remodelleerimisele ka mitmesuguste teiste rakuprotsesside regulatsioonil, sealhulgas rakutsükli regulatsioonil, RNA metabolismil, tsütoskeleti dünaamikas ja peamistes metaboolsetes radades - glükolüüsil, glükoneogeneesil ja tsitraaditsükli. Hoolimata sellest, kas valke atsetüleeritakse läbi ensümaatiliste või mitteensümaatiliste protsesside (vaidlus selle teema üle käib), kasutatakse doonorina AcCoA-d. Nende rühmade elimineerimisega tegeleb terve perekond valke, millest enim tuntud on klass III mittehistsoonid deatsetülaasid sirtuiinid tänu nende assotsiatsioonile vananemise ja metaboolsete haigustega (Houtkooper jt., 2012).

Kuna valkude atsetüülimine ja deatsetüülimine on laialt levinud regulatiivsed mehhanismid, mis on seotud peaaegu 2000 sihtmärgi moduleerimisega (Brock, 2011; Drazic jt., 2016), omab AcCoA kontsentratsioon olulist mõju läbi selle mehhanismi paljudele raku funktsioonidele. Paljud atsetüleeritud valgud lokaliseerivad tuumas või tsütosoolis ja nende atsetüleeritus aste sõltub AcCoA kontsentratsioonist nukleotsütosoolises fraktsioonis. Samuti korreleerub ka mitokondriaalsete valkude atsetülatsioon AcCoA taseme muutustega, mida demonstreerib mitokondriaalsete valkude atsetülatsiooni sõltuvus PDH subühikust PDA1-st (Lin jt., 2009; Galdieri jt., 2014). Kuna AcCoA-d ei transpordita otse mitokondrist tsütosooli vaid läbi tsitraadi süstiku, sõltub tsütosoolsete ja nukleaarsete valkude atsetülatsioon lisaks tsitraadi transporterile ka kahest AcCoA-d produtseerivast ensüümist: atsetaat-sõltuv AcCoA süntetaas 2 (ACSS2) ja tsitraat-sõltuv ATP-tsitraadi lüaas (ACL) (Pietrocola jt., 2015). On leitud, et rakukultuuris on ACL vajalik histoonide atsetüülatsiooni suurendamiseks vastusena kasvufaktori stimulatsioonile ja diferentseerumisele ning seda, et glükoosi kättesaadavus võib mõjutada histooni atsetüülatsiooni läbi AcCoA kontsentratsiooni ja ACL-i (Wellen jt., 2009). See tulemus näitab, et ACL-i aktiivsus on vajalik selleks, et seostada kasvufaktori poolt indutseeritud toitainete metabolismi suurendamist histoonide atsetüülatsiooni ja geeniekspressiooniga. Glükoosi puudusest tingitud defekti oli võimalik kompenseerida, lisades söötmesse eksogeenseid AcCoA allikaid. ACL-sõltuv AcCoA tootmine soodustab histooni

atsetüülatsiooni suurenemist. Samuti võib ACL-sõltuv atsetüülatsioon soodustada glükoosi metabolismis osalevate geenide selektiivset regulatsiooni (Mews jt., 2017; Wellen jt., 2009). Selline tsentraalsete metaboliitide otsene osalemine PTM-is võimaldab rakkudel adekvaatselt reageerida keskkonna muutustele, integreerides ainevahetuse muutusi ensüümide aktiivsuse regulatsiooni kaudu rakulistesse otsustesse (Fan jt., 2015). Huvitavalt kombel on kirjeldatud ka otsest seost mtDNA ja histoonide atsetüülatsiooni vahel, kus mtDNA taseme langus tõi kaasa tsütosoolse AcCoA puuduse läbi TCA tsükli defekti, mis mõjutas oluliselt väljaspool mitokondrit olevate valkude nagu histoonide atsetüülatsiooni (Martinez-Reyes jt., 2016). Seega on demonstreeritud mtDNA stabiilsuse ja atsetüülatsiooni vahelist seost ning seda, kuidas mitokondriaalsed sündmused võivad teoreetiliselt mõjutada globaalseid rakulisi sündmusi läbi atsetüülatsiooni.

Viimasel kümnendil tesotatud uuringud on näidanud, et lisaks AcCoA-le võivad ka teised mitokondriaalsed metaboliidid, mida tavaliselt on peetud energiatootmise vahendajateks, toimida signaalimolekulidena, soodustades valkude PTM-e või mõjutades kromatiini struktuuri ja funktsiooni (Frezza, 2017). 2OG on 2OG-sõltuvate dioksügenaaside kosubstraadiks (2OGDD). 2OGDD osalevad mitmetes bioloogilistes protsessides, sealhulgas valkude hüdroksüleerimises ja DNA ning histoonide demetüleerimisel. On demonstreeritud 2-OG kontsentratsiooni olulisust rakkude differentseerumise määramisel, nimelt soodustab kõrge 2-OG kontsentratsioon embrüonaalsetes tüvirakkudes histoonide/DNA demetüülatsiooni ja tagab seeläbi pluripotentsuse. Veelgi enam, näidati, et selle epigeneetilise funktsiooni tõttu võib 2OG soodustada hiire ja inimese pluripotentsete tüvirakkude varajast diferentseerumist.

AcCoA-ga sarnanev TCA metaboliit suksinüül-CoA (SuccCoA) on samuti oluline signaalmolekul, seda eelkõige lüsiini suksinüülatsiooni puhul, mis on hiljuti avastatud PTM (Choudhary jt., 2014). Suksinüülatsiooni mõju valgu funktsioonile on endiselt ebaselge, kuid protsess on laialt levinud ja modifitseeritavad lüsiinid on tihtipeale samad, mida ka atsetüleeritakse. Analoogselt atsetüülatsiooniga suksinüüleeritakse ka histoone, mis viitab selle modifikatsiooni võimele mõjutada ka raku epigeenetikat (Xie jt., 2012), laiendades võimalikke mehhanisme, mille kaudu mitokondriaalsed metaboliidid võivad modifitseerida kromatiini struktuuri ja funktsiooni.

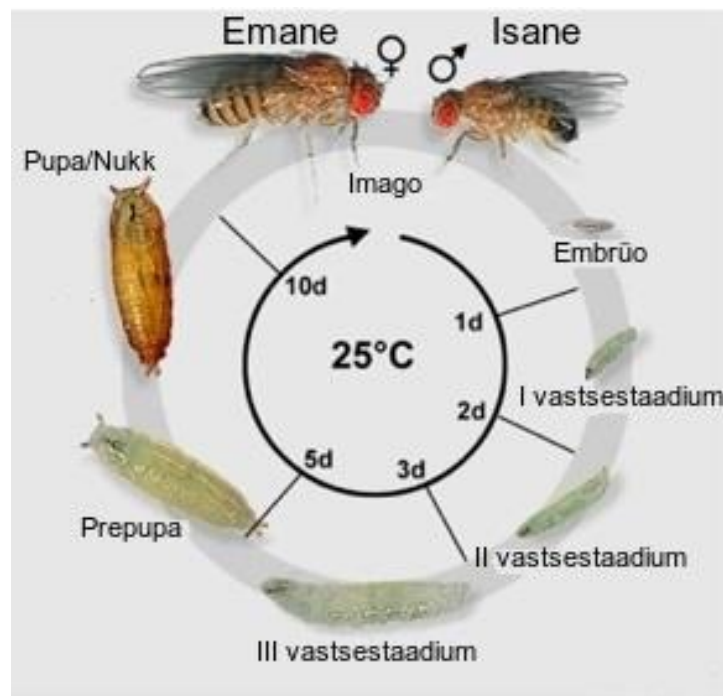
Suksinaadi akumulatsioon viib 2OGDD inhibeerimisele konkureerides tema kofaktori 2-OG-ga. Sellel protsessil on olulised geneetilised ja epigeneetilised tagajärjed. Oli leitud, et suksinaat võib inhibeerida prolüülhüdroksülaase (PHD) ning ka histooni ja DNA

demetülatsiooniga seotuid 2OGDD-d. Sarnaselt suksinaadiga põhjustab fumaraadi akumulatsioon 2OGDD inhibitsiooni takistades 2-OG seostumist, k.a. PHD-d ja histooni ning DNA demetülaaside inhibitsiooni. DNA demetülaaside inhibeerimise kaudu seostati fumaraadi akumulatsiooni antimetastaatiliste mRNA-de, hüpermetülatsiooni ja sellele järgneva epigeneetilise supressiooniga, mis põhjustas epiteel-mesenhümaalse metaplaasiat epiteelirakkudes. Lisaks põhjustavad fumaraadi kõrged tasemed valgu suksinatsiooni, valgu tsüsteiniinijääkide posttranslatsioonilist modifitseerimist. Lisaks sellel on näidatud ka fumaraadi mõju kinaas TBK1-le, mis viib NF-KB signaaliülekanne aktiveerimisele. Seetõttu näib, et sarnaselt suksinaadile on fumaraat oluline mitokondriaalne signaalmolekul, mis on võimeline esile kutsuma mitokondriaalse düsfunktsiooni juuresolekul laia geneetilist ja epigeneetilist ümberprogrammeerimist (Sciacovelli ja Frezza, 2016; Frezza, 2017).

### **1.6 *Drosophila melanogaster* mudelorganismina**

*Drosophila melanogaster* ehk harilik äädikakärbes on olnud kasutusel mudelorganismina geneetikas ja molekulaarbioloogias juba üle saja aasta. Nende peamisteks eelisteks on suhteline odavus, väike kromosoomide arv (genoom sekveneeritud juba aastast 2000), suure hulga geneetiliste tööriistade ja modifikatsioonide olemasolu, suur viljakus ja suhteliselt lühike generatsiooniaeg ning eluiga (umbes 10 päeva optimaalsel temperatuuril), nii et lühikese aja jooksul saab korraldada ulatuslikke ristamisi üle mitme põlvkonna ja genereerida transgeenseid tüvesi (Prokop, 2013; Ashburner jt., 2005). See võimaldab mugavalt jälgida geneetilisi muutusi põlvkondade lõikes lühikese aja jooksul (Sang, 2001). Algselt on tegemist subtroopilisi ja troopilisi laiuskraade asustavate putukatega, kellede eelistatuks toiduks on süsivesikute rikkad taimese osad nagu puuviljad (Demerec ja Kaufmann, 1972). Lisaks on *Drosophila*'te kultiveerimine suhteliselt lihtne ja odav ning ei koorma uurimisgrupi ressursse nii nagu näiteks hiire mudel. Tänu pikaajalisele kasutamisele mudelorganismina on kogunenud väga suur hulk tehnikaid ja geneetilisi tööriistu, mis võimaldavad ulatuslikult ja spetsiifiliselt modifitseerida *Drosophila* genoomi (Prokop, 2013). On leitud, et umbes 50% *D.melanogaster*'i geenidest on homoloogsed inimese geenidega ning 60-70% inimeste pärilikkude haigustega seotuid gene on olemas ka *D.melanogaster*'is. Seetõttu on uuringud *D. melanogaster*'s oluliselt kontribueerinud mitmete inimese haiguste uuringutel, näiteks parkinsonism (Hewitt ja Whitworth 2017), rasvumine (Trinh ja Boulianne 2013), südamehaigused (Piazza ja Wessells 2011), vaimsed häired (Pandey ja Nichols 2011), neuroloogilised haigused (Pandey ja Nichols 2011), Huntingtoni ja Alzheimeri tõbi (Prokop, 2013).

*D. melanogaster* on holometaboolne ehk täismoondega putukas, millel on neli erinevate elutsükli: muna (embrüo), vastne, nukk ja valmik (vt. Joonis 3). Optimaalsetes tingimustes (25°C, küllaldaselt toitaineid ja vett) on *Drosophila* ontogeneesi kestus ca 10 päeva, madalamatel temperatuuridel on see oluliselt pikem. Embrüogenees kestab optimaalsete tingimuste juures 24 tundi ning edasi järgneb vastsestaadium, mis koosneb enamasti kolmest staadiumist L1, L2 ja L3, millest kaks esimest kestab 1 ning kolmas 2 päeva (Markow, 2015; Prokop, 2013). L3 faasis vastse kehamass suureneb ning aktiveeritakse signaalirajad, mille tulemusena muutub vastse käitumine ja algab metamorfoos; ta lahkub söötimest, liigub negatiivse geotaksise tulemusena ülespoole ja nukkub. Nukustaadium kestab umbes 5 päeva ning peale nukust väljumist emased omandavad võime paarituda 25°C juures mitte varem kui 8-10 tundi. 18°C juures ontogenees on kaks korda pikem kui optimaalsetes tingimustes ning emased saavutavad viljastumisvõime alles kuskil 16 tunniga (Ashburner jt., 2005). See annab võimalust pikendada emaste kärbeste neitsiperioodi ning hoida neid neitsitena kuni ristamiseni soovitud tüve isastega (Markow, 2015; Prokop, 2013; Ashburner jt., 2005).



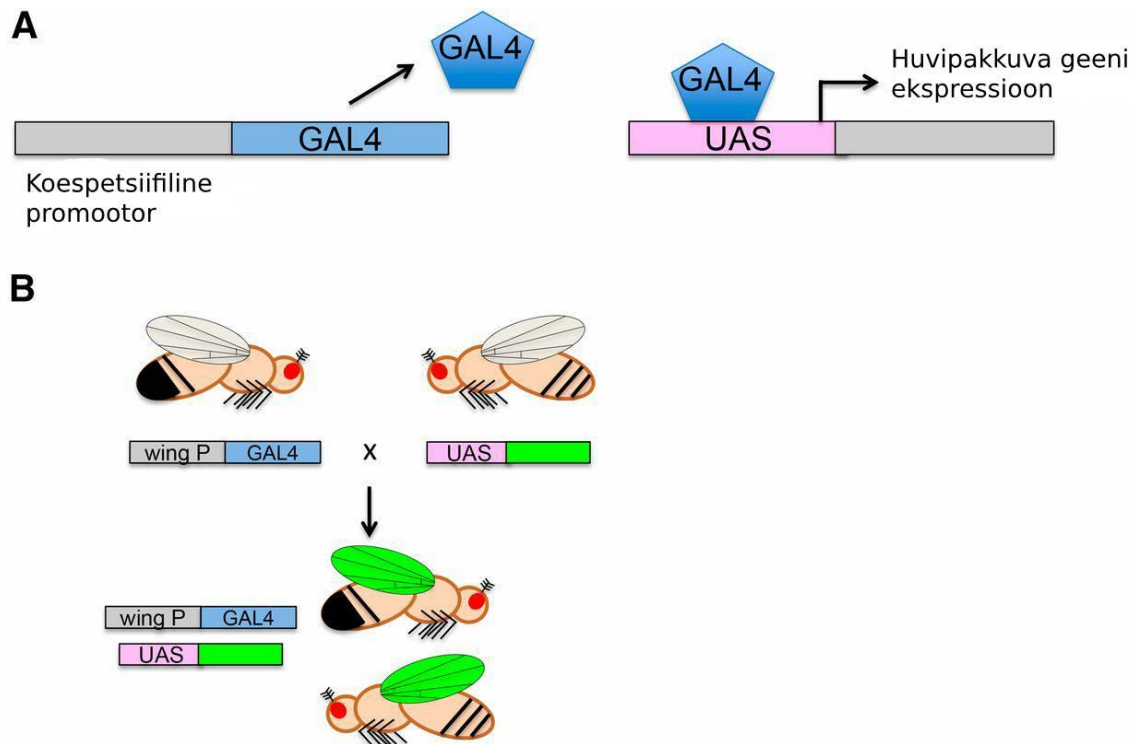
**Joonis 3.** *Drosophila melanogaster*'i elutsükkel. Joonis on kohandatud artiklist Prokop, 2013.

Emased ja isased selgelt eristatakse tagakeha pigmentatsiooni, suguelundite struktuuri ja harjaste esinemise isaste esijalgadel (Ashburner jt., 2005; Prokop, 2013). Geneetilistel ristamistel kasutatakse nn. "markermutatsioone", mille fenotüüpi on võimalik lihtsalt determineerida vaatluse abil (näit. silmade värv, keha värv, tiibade morfoloogia jne.). See

võimaldab kiiret ja mugavat geneetilisi modifikatsioone kandavate isendite identifitseerimist ja selektsiooni (Prokop, 2013; Hales jt., 2015). Kõige laiemalt levinud markeriks on silmade pigmentatsiooni tagav geen *white*, mis kodeerib *Drosophila* valgustundliku pigmendi transporterit ning mille puudumisel või funktsiooni defekti korral ei värvu silmad punaseks. Antud geneetilises taustaga kärbest geneetilisel modifikatsioonil kasutatakse *white* geeni minimaalset järjestust (nn. mini-*white*), mis taastab silmade algse punase pigmentatsiooni ja võimaldab seeläbi lihtsalt jälgida ja isoleerida modifitseeritud isendeid. (Pirrotta, 1988; Ashburner jt., 2005; Prokop, 2013; Hales jt., 2015)

### 1.6.1 GAL4-UAS ekspressioonisüsteem

Transgeensete valkude ekspressioonil laialdast kasutust leidev binaarne ekspressioonisüsteem GAL4-UAS koosneb kahest komponendist: pärmi transkriptsiooni aktivaatorvalgust GAL4-st ning märklaudjärjestusest UAS-st, mis liidetakse ekspresseeritava geeni kodeerimisjärjestuse ette (del Valle Rodríguez jt., 2012). Kontrollides GAL4 ekspressiooni läbi koespetsiifiliste promootorjärjestuste, on võimalik tagada UAS-järjestusega liidetud geenide kõrgelt selektiivset ekspressiooni (vt. Joonis 4). Antud süsteemi on osutunud väga paindlikuks ja kasulikuks mehhanismiks paljudes organismides ning on leidnud laialdast rakendust ka *D. melanogasteri*'s. Seda on edukalt kasutatud erinevates rakendustes: transgeenide ekspressioonil, spetsiifiliste geenide allasurumisel läbi RNAi ekspressiooni ja teatud rakutüüpide ja kudede ablatsioonil. Lisaks spetsiifilise promootori kaudu teostatavale kontrollile ekspressioonimustri üle, on võimalik tagada ka ajalist kontrolli läbi GAL4-UAS edasiarenduse läbi *GeneSwitch*-GAL4 (GS) süsteemi läbi (Brand ja Perrimon, 1993; Duffy, 2002; Osterwalder jt., 2001; Hales jt., 2015).

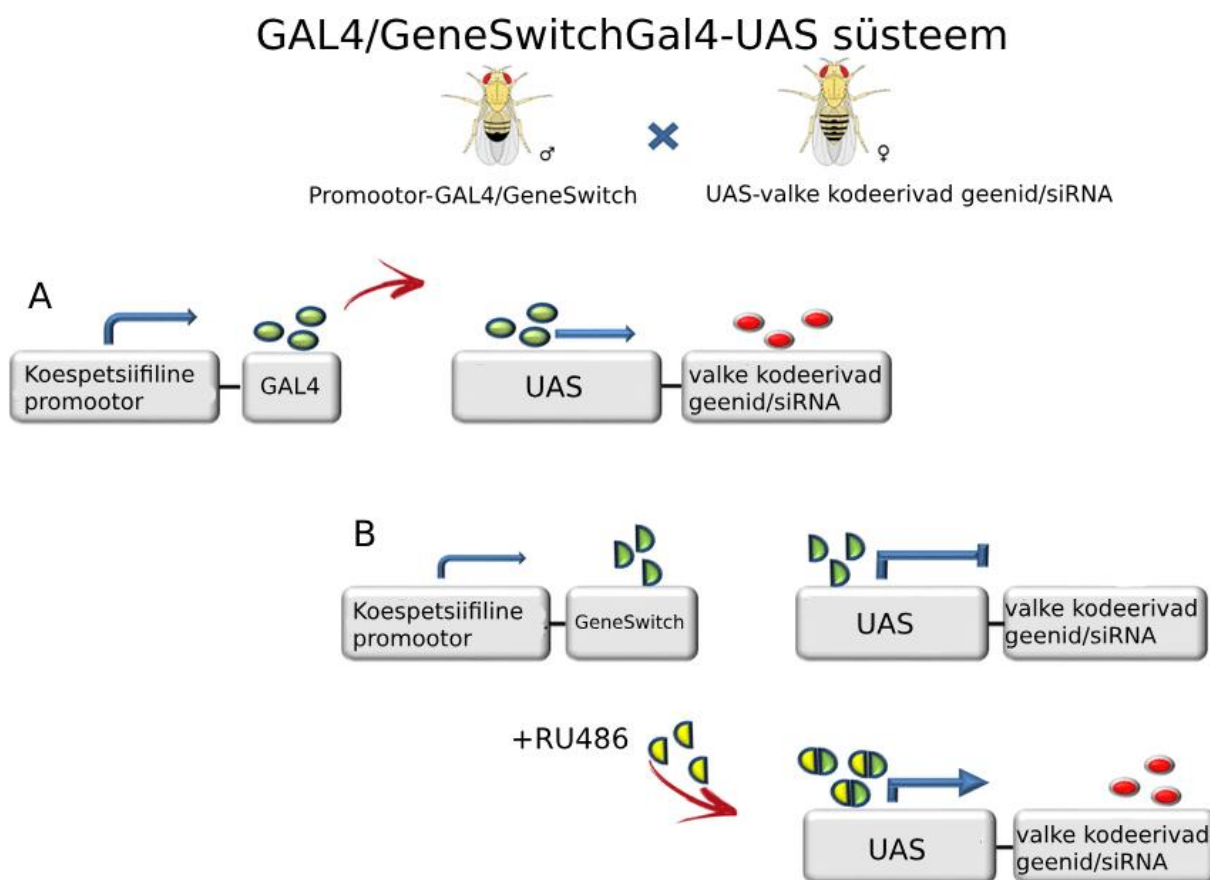


**Joonis 4. GAL4-UAS süsteem transgeensete valkude ekspressiooniks spetsiifilistes kudedes.** (A) Transgeeni ekspresseerimiseks on vaja kahte kärbsetüve. Ühe kärbsse genoom sisaldab GAL4 transkriptsiooni aktivaatorvalku kooos koespetsiifilise enhanseriga (nn. „driver“) ning teise kärbsse genoom sisaldab geeni või RNAi konstrukti järjestust, mille ette on asetatud UAS. (B) Transgeensed emased, mis kannavad UAS “responderit” ja huvipakkuvat geeni (roheline) ristatakse transgeensete isastega, kellel on koespetsiifiline (antud juhul ekspresseeritud tiibades) “driver”. Järglastel ekspresseeritakse huvipakkuv geen ning on olemas mõlema süsteemi elemente. Joonis on kohandatud artiklist Hales jt., 2015.

Antud süsteem on GAL4-UAS modifitseeritud versioon, mis baseerub GAL4 transkriptsioonifaktori ja progesterooni retseptori liitvalgul ning võimaldab reguleerida geeniekspressiooni (vt. Joonis 5) (Scialo jt., 2016). Huvipakkuv geen aktiveeritakse vaid siis, kui progesterooni retseptori domään seondub ligandiga, milleks kasutatakse toiduga manustatavat sünteetilist keemilist ühendit RU486 ehk mifepristooni (vt. Joonis 5). Selle tulemusena muutub transkriptsioonifaktor aktiivseks ja alustab UAS-järjestuse kontrolli all oleva transgeeni ekspressiooni. *Drosophila* genoomi lülitatakse ülalpool kirjeldatud konstruktid enamasti P-elementide järjestuste abi, milleks on transposon täisjärjestusega 2907 aluspaari. P-elementid on transposonid, mis kodeerivad funktsionaalset transposaasi, mis võimaldab liigutada antud transposonitest eraldatuid P-järjestusi kandvaid geneetilisi elemente genoomis “lõika-ja-kleebi” mehhanismi abil (Hales jt., 2015; Brand ja Perrimon, 1993). See transposasaas tunneb ära kahte spetsiifilist järjestust, mille kaudu toimub genoomist väljalõikamine ning uus juhuslik insertioon. Brand ja Perrimon kasutasid esimestena seda



lähenedist, kloneerides GAL4 P-elementi vektorisse ja demonstreerides sellise meetodika kasutatavust geenide ekspressiooni kontrollimisel (Brand ja Perrimon, 1993; Hales jt., 2015; Osterwalder jt., 2001; Scialo jt., 2016).



**Joonis 5.** *GeneSwitch*GAL4-UAS süsteemi skemaatiline skeem. (A) GAL4-UAS süsteem võimaldab geeniekspressiooni ruumilist kontrolli. (B) *GeneSwitch* (GS) süsteem võimaldab geeniekspressiooniga ajaliselt manipuleerida tänu modifitseeritud GAL4 valgule, mis on aktiivne ainult siis, kui sünteetiline progesteroni analoog (mifepriistoon, RU486) seondub kondenseeritud progesteroni steroidiretseptoriga. RU-486 puudumisel säilitatakse GAL4 aktiivsus minimaalselt. Joonis on kohandatud artiklist Scialo jt., 2016.

Traditsiooniliselt on transgeenseid kärbeid loodud P-elementi vahendatud transformatsiooni alusel, mis inserteerib neid geneetilisi elemente genoomis juhuslikult. See aga tõstatab insertioonikohtade probleemi, nimelt võib uue geneetilise elemendi juhuslik insertioon rikkuda olemasoleva geeni kodeerimisjärjestust või regulaatoriipiirkondi. Seepärast analüüsitakse pärast transformatsiooni läbi hulgaliselt tüvesi, et vältida antud situatsioone, kuid mis on nii ressursi- kui ka ajakulukas protsess. Samuti ei ole ka intergeensetes regioonides paiknevad insertioonid tihti vabad võimalikust mõjust teistele geenidele ning transgeeni ekspressioon on mõjutatud positsiooniefektist. Viimasel ajal on selliste nähtuste vältimiseks

üha laialdasemalt kasutatud koht-spetsiifilise integratsiooni phiC31 ( $\phi$ C31) integraasi süsteemi. See lähenemine on tõhusam kui traditsioonilised meetodid ja tagab transgeeni täpsemat suunamist genoomis ettevalmistatud „maandumisplatvormile“. Meetod hõlmab eksogeense geneetilise elemendi (mis sisaldab transgeeni ja järjestusi integratsiooni toimumiseks) integreerimist *Drosophila* genoomi täpselt defineeritud kohta eelnevalt integreeritud järjestuste abil. Plasmiid sisestatakse embrüodesse koos phiC31 integraasi kodeeriva mRNA või plasmiidiga, millel on integratsiooni reaktsiooni katalüüsiva ensüümi geen. Bakteriofaag phiC31 integraas kodeerib seriin-tüüpi rekombinaasi, mis vahendab järjestuse-spetsiifilist rekombinatsiooni kahe järjestuse attB ja attP vahel. Kuna kaks phiC31 integraasi poolt tuvastatud järjestust on erinevad ja rekombinatsiooniprotsess segab omavahel kaks järjestust (attR ja attL), on phiC31-l põhinev integratsioon ühesuunaline. Peamisteks süsteemi plussideks peetakse seda, et meetod on äärmiselt tõhus võrreldes P-elementi vahendatud insertiooniga, mille puhul integratsioonisagedused võivad läheneda 70%-le. Lisaks võib transgeene saada soovitud kohas ning tulemusi on võimalik otseselt võrrelda (kuna transgeeni asukohta kontrollitakse, saab kõiki samasse lookusse integreeritud konstruktsioonidel identne geneetiline kontekst) (Bischof jt., 2007; Fish jt., 2007).

### 1.6.2 Transgeense mtDNA stressisüsteemi tutvustus

Eelneva uurimistöö käigus Priit Jõersi töörühmas oli välja töötatud uudse süsteemi mtDNA stressi tekitamiseks *D. melanogasteris*. Selleks on konstrueeritud *D. melanogaster*'i tüvi, mis kannab P-elementide ja phiC31 süsteemi abil integreeritud GAL4-UAS süsteemi kontrolli all mitokondriaalse signaaljärjestusega liidetud kõiki kolme bakteriaalse endonukleaasi EcoBI subühiku geeni (*HsdM*, *HsdS* ja *HsdR*). Antud tüüpi endonukleaas omab kolme seostumisjärjestust *D. melanogasteri* mitokondriaalses genoomis. Tüüp I endonukleaasi tööpõhimõte seisneb selles, et pärast kontakti loomist seostumisjärjestust omava DNA-ga (kui selles järjestuses paiknevad adeniinid pole metüleeritud), hakkab ta translokeerima DNA-d, säilitades samal ajal kontakti oma seostumisjärjestusega (Murray, 2000). Tüüp I endonukleaasi tekitab kaheaheelise katke juhuslikku kohta translokatsiooni peatumisel ning see võib paikneda tuhandete nukleotiidide kaugusel EcoBI seostumisjärjestusest. Selleks, et eraldada DNA fragmentatsioonist või translokatsioonist põhjustatud efekti, oli genereeritud punktmutsatsioonide viimisega R subühikusse kaks erinevat mtEcoBI isovormi lisaks metsiktüüpi valgule: endonukleaas-defektne kuid translokatsiooniliselt aktiivne (endo-, muteeritud subühiku nimetus R2) ja ensümaatiliselt täiesti inaktiivne vorm (endo/trans-, muteeritud

subühiku nimetus R4). Enne minu liitumist töögrupiga oli kindlaks tehtud, et süsteemse indutseeritud ekspressiooni tulemusena täiskasvanud kärbses põhjustatud mtDNA degradatsiooni tase oli piisavalt madal, et mitte põhjustada OXPHOS-i defekte. Üllatuslikult viis see aga süsivesikute tarbimise inhibitsioonile läbi kahekihilise mehhanismi. Neist üheks oli glükoosi transpordi inhibitsioon rakku tänu Akt kinaasi inaktivatsioonile, mis oli indutseeritud spetsiifiliselt mtEcoBI endonukleaasse aktiivsuse poolt (Bahhir jt., 2019). Kuna ka endo-mtEcoBI versiooni kandvas *D. melanogasteri* tüves tekkis süsivesikute tarbimise defekt (mõnevõrra nõrgem kui funk mtEcoBI-ga tüves), peab metaboolse painedumatus tekkesse kontribueerima ka teine, mtEcoBI translokatsiooni aktiivsusega seotud tundmatu mehhanism.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärk

Minu töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas mitokondri metabolism on muutunud vastusena süsivesikute tarbimise inhibitsioonile kompleks II näitel ning millise fenomeni kaudu inhibeerib mtEcoBI süsivesikute tarbimist lisaks Akt inhibitsioonile.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 *Drosophila* käitlemine, ristamine ja tüved

*D. melanogasteri* suuremate või väiksemate kärbskoguste kasvatamiseks kasutati vastavalt vajadusele erineva suurusega plastikkonteinereid (pudeleid ja viaale) ning hoiti neid 18°C või 25°C kapis. *Drosophila*'tega töötamisel kasutati CO<sub>2</sub> anesteasiat, mis võimaldab hoida kärbsed liikumatuna. Anesteasiat kärbsede uimastamiseks saab kasutada mitte kauem kui pool tundi, kuna see hakkab negatiivselt mõjutama kärbsede elulemisele.

Konteinerites oleva söötme koostis oli järgmine:

**Tabel 2.** Töös kasutatud söötmete koostis.

Koostis	Kogus
Agar	1%
Pärm	3,5%
Maisijahu	1,5%
Sojajahu	1%
Sahharoos	1,5%
Glükoos	3%
Suhkrusiirup	3%
Propioonhape	0,5%
Nipagiin	0,1%

Agar, pärm, maisijahu ja sojajahu segati vees, kuumutati keemiseni ning lisati sahharoos, glükoos ja suhkrusiirup. Söödet keedeti veel 20 minutit, pärast mida lasti jahtuda magnetsegajal vähemalt 65°C-ni. Pärast seda söötmele lisati antifungitsiidseid ja antibakteriaalseid aineid

propioonhappe ja nipagiin ning vajadusel mifepristooni (MP) lõppkonsentratsioonis 200  $\mu$ M, millega indutseeriti *GeneSwitch* süsteemi kaudu mtEcoBI ekspressioon. Pärast segamist jaotati söötmed vastavalt vajadusele 4 ml, 7,5 ml ning 35 ml kaupa konteineritesse ning lasti tarduda umbes 2 tundi toatemperatuuril. Hiljem söödet korgiti ning hoiti 4°C juures maksimaalselt 3 nädalat.

*Drosophila*'te ristamine ja ekspressiooni induktsioon:

*Drosophila* neitsite (viljastamata emased) hoiti äädikakärbseid pärast nukkudest koorumise algust 18°C juures eesmärgiga pikendada perioodi, mille jooksul koorunud emased ei kopuleeru. Neitsid eraldati hommikul enne kella 9:00 ja õhtul kella 17:00 ajal. Kuna 18°C juures on neitsiperiood 16 tundi, tagati sellega kõikide emaste neitsiks olemine. Värskest koorunud kärbsed ei pigmenteeru täielikult paari esimese elutunni jooksul, seega on kõik vähe pigmenteerunud emased neitsid. Peale nukust koorumist korjati neitseid uutesse viaalidesse senikaua, kuni neid oli ristamiseks piisav arv ning isased elimineeriti. Selektatsioon põhines sugulisel dimorfismil ehk suurusel, tagakeha värvusel ja harjaste esinemisel esikäppadel. Enne ristamist kontrolliti veelkord nende sugu (vältimaks valesst tüvest isaste sattumist ristamisse) ning söötme pinda, kas on märgata arenevaid larve söötmel, kus hoiti neitseid. Sellisel juhul oleks vähemalt üks emastest olnud juba eelnevalt viljastatud. Larvide või isaste tuvastamisel elimineeriti kõik antud viaalis olnud emased. Kärbeste ristamisel võeti isaseid ja emaseid suhtes 1:2, absoluutarvudes 30:60 ühe pudeli kohta. Pudeleid hoiti kolm päeva 25°C juures, pärast mida kärbeste vanemad kanti vajadusel üle uutesse pudelitesse või elimineeriti. Larvistaadiumis järglaskonnaga pudeleid inkubeeriti 25°C juures, täiskasvanud isendid koguti järgnevateks eksperimentideks mitte rohkem kui 3 päeva jooksul alates nukust koorumisest. Koorunud kärbestest selekteeriti isased 1-2 ööpäeva jooksul pärast koorumist ja kanti kas tavalisele söötmele, mis sisaldas 200  $\mu$ M MP-d (*tubGS>mtEcoBI*). Kärbsed kanti värsketele söötmele iga 48 tunni tagant ja ajapunktid korjati päevadel 6. ja 10. päeval *tubGS>mtEcoBI* tüvede puhul.

Käesolevas töös kasutatud *Drosophila*'te tüved on kirjeldatud Tabelis 3.

**Tabel 3.** Töös kasutatud *Drosophila*'te tüvede nimetused, kirjeldused ja genotüübid.

<b>Tüve nimi</b>	<b>Genotüüp</b>	<b>Allikas</b>	<b>Kommentaariid</b>
endo/trans-	<i>UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS; UAS-mtHsdR (K477R)/UAS-mtHsdR (K477R)</i>	Bahhir jt., 2019	Ensümaatilisel inaktiivset mtEcoBI varianti kandev tüvi.
endo-	<i>UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS; UAS-mtHsdR (D298E)/UAS-mtHsdR (D298E)</i>	Bahhir jt., 2019	Defektse endonukleaasse aktiivsusega mtEcoBI variant kandev tüvi.
funk.	<i>UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS; UAS-mtHsdR/UAS-mtHsdR</i>	Bahhir jt., 2019	Funktsionaalset mtEcoBI varianti kandev tüvi.
tubGS	<i>tubGS/tubGS</i>	Scott Pletcheri grupp	Tubuliini promootori kontrolli all olevat GeneSwitch transkriptsiooni aktivaatorit kandev tüvi.

### 2.2.2 Kärbeste eluea määramine

*Drosophila* eluea määramiseks võeti iga tüve kohta kolme erinevatesse viaalidesse mitte rohkem kui 3 päeva vanust 20 isast kärbest (60 kokku). Kärbsed kanti uutesse viaalidesse värske söötmega iga kahe päeva tagant. Iga päev vaadeldi söödet ning registreeriti surnud kärbeste arv kuni viimane kärbes oli surnuks tunnistatud.

### 2.2.3 Western blot

30 isast kärbest homogeniseeriti uhmrinuiaga 300 µl homogenisatsiooni puhvris (1,5% Triton X-100 (w/v); Roche'i Complete Mini EDTA-vaba proteaasi inhibiitor – 1 tbl/10 ml; Roche'i PhoSTOP fosfataasi inhibiitor – 1 tbl/10ml; PBS, 10 mM naatrium butüraat, 20 mM nikotiinamiid ja 20 mM trihhostatiin A) ning lüsaate inkubeeriti jää peal 15 minutit. Edasi proove tsentrifuugiti põhja lauatsentrifuugis tingimustel 4°C, 13.000 x g, 15 minutit. Saadud saade suspendeeriti homogenisatsiooni puhvris suhtes 1:5 uutesse 1,5 ml tuubidesse ning mõõdeti valgu kogus Bradfordi meetodi abil. Lüsaate hoiustati vajadusel -80°C juures kuni analüüsimiseni. Enne westerni algust suspendeeriti lüsaadid laadimispuhvris (50mM Tris·HCl pH=6.8; 0,01% värvaine Serva Blue G; 4% SDS; 12% glütserool, 0,1M DTT) uutes 1,5 ml tuubides ning saadud lahust inkubeeriti 5 minutit 96°C juures. Westerni tegemiseks kasutati Bio-Rad AnyKD (Criterion™ TXG™ Precast Gels) eelvalatud gradientgeeli, millele kanti 60 ug valgusegu proovi kohta. Valkude ülekandelt geelilt nitrotselluloosmembraanile (GE Healthcare Amersham™ Protran™ 0,45 µm) kasutati *wet-transfer* meetodit. Selleks niisutati *transfer*-puhvris 3 filterpaberit, nendele asetati niisutatud geel, membraan ning veel 3 filterpaberit. Ülekandeks voolutati 35 V juures 50 minutit (Bio-Rad PowerPac™ HC High-Current Power Supply, CA, USA). Pärast membraani eemaldamist vooluplokist tehti blokeerimine 60 minutit toatemperatuuril loksutil blokeerimislahusega. Edasi inkubeeriti membraani primaarse antikehaga üle öö loksutil 4°C juures ning järgnes pesu 3 x 15 minutit Westerni pesulahusega. Seejärel inkubeeriti membraani sekundaarse antikehaga 1-3 tunni vältel toatemperatuuril loksutil. Sekundaarsete antikehadena kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG vastast kitse antikeha (goat anti-rabbit AlexaFluor® 488 IgG (H+L)) või hiire IgG vastast kitse antikeha (AlexaFluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L)). Inkubeerimisele järgnes 3 x 15 minutit loksutil Westerni pesulahusega.

Käesolevas töös kasutatud inkubatsioonipuhvrid, antikehad ja antikehade lahjendused on kirjeldatud Tabelis 3.

**Tabel 3.** Inkubatsioonipuhvrid ja antikehade lahjendused.

<b>Antikeha</b>	<b>Inkubatsioonipuhver</b>	<b>Primaarse antikeha lahjendus</b>	<b>Sekundaarse antikeha lahjendus</b>
<b>Atsetüleeritud lüsiin (#9441)</b>	2,5% milk in TBS + 0,1% Tween	1 : 3 000	1 : 10 000
<b>NDUFS3 (ab14711)</b>	5% milk in PBS + 0,05% Tween	1 : 3 000	1 : 10 000
<b>pan-histoon 3 (ab1791)</b>	5% BSA in TBS + 0,1% Tween	1 : 5 000	1 : 10 000
<b>Atsetüleeritud histoon 3 (ab47915)</b>	5% BSA in TBS + 0,1% Tween	1 : 5 000	1 : 10 000

Signaali visualiseerimiseks kasutati ECL (Bio-Rad Clarity™ Western ECL Substrate) vastavalt tootja protokollile ning membraanil olevat signaali analüüsiti BioRad (Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+) masina abil optimaalse pikkusega säriaajaga, et mitte kvantifitseerida üleeksponeeritud piksleid. Westerni signaal normaliseeriti üldise valgukoguse vastu. Selleks värviti membraani 15 minutit Ponceau S värvilahusega (0,1% Ponceau S värv, 5% etaanhape) ning pilt tehti sama masinaga. Mitokondriaalse fraktsiooni atsetülatsiooni mõõtmise korral normaliseeriti tulemused kompleks I subühiku NDUFS3-vastase antikehaga märgitud westerni signaali vastu. Kvantifitseerimist teostati Image Lab programmiga, tulemused normaliseeriti taustamürana defineeritud kvantifitseerimise regioonide vastu (vt. Lisad).

#### **2.2.4 Triatsüülgütseriidide mõõtmine**

Triatsüülgütseriidide (TAG-de) mõõtmiseks jälgiti vaba glütserooli teket pärast rasvade lipolüüsi kasutades selleks triglütseriidide reagenti (Triglyceride Reagent, Sigma, T2449) ja vaba glütserooli reagenti (Free Glycerol Reagent, Sigma, F6428). Triglütseriidide reagent sisaldab lipaasi, mille toimetel proovis olevad triatsüülgütseriidid hüdrolyüsitakse glütserooliks ja vabadeks rasvhapeteks. Vaba glütserooli reagent lahuses võimaldab mõõta glütserooli läbi järjestikuste reaktsioonide, mille lõpptulemusena tekib värvaine, mida on võimalik detekteerida spektrofotomeetri abil. Reaktsioonis vaba glütserool fosforüleeritakse adenosin-5'-fosfaati



(ATP) abil glütserool-1'-fosfaadiks (G-1-P) ja adenosiin-5'-difosfaadiks (ADP) reaktsioonis, mis katalüüsitakse glütserooli kinaasi poolt (GK). G-1-P oksüdeeritakse glütserooli fosfaatoksüdaasi (GPO) abil dihidroksüatsetoon fosfaatiks (DAP) ja hüdrogeeniperoksiidiks ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Peroksüdaas (POD) katalüüsib  $\text{H}_2\text{O}_2$  4-aminoantipüriini (4-AAP) ja naatrium N-etüül-N-(3-sulfopropüül) m-anisidiiniga (ESPA) muutumise värvaineks kvinoneimiin mille neelduvusmaksimum on 540 nm juures. Kvinoneimiini kontsentratsioon lahuses on proportsionaalne algse triatsüüoglütseriidide kontsentratsiooniga.

TAG-de mõõtmiseks 20 isast kärbest homogeniseeriti 800  $\mu\text{l}$  PBS-Tweenis (0,1%) jääl. Järgnevalt inkubeeriti lüsaati 5 minutit  $70^\circ\text{C}$  juures selleks, et inaktiveerida endogeenseid lipaase. Peale seda, 20  $\mu\text{l}$  kuumtöödeldud lüsaati eraldati uutesse 1,5 ml tuubidesse ja lisati 20  $\mu\text{l}$  triglütseriidide reagenti (250 U/ml). Teise uutesse 1,5 ml tuubidesse pandi samuti 20  $\mu\text{l}$  kuumtöödeldud lüsaati, millele lisati 20  $\mu\text{l}$  PBS-i. Saadud proove inkubeeriti 30 minutit  $37^\circ\text{C}$  juures. Peale seda, homogenaate tsentrifuugiti 15 sekundi jooksul lauatsentrifuugis  $10.000 \times g$  juures. Edasi TAG-de mõõtmiseks kanti 96-mikroitiiterplaadile 100  $\mu\text{l}$  vaba glütserooli reagenti, millele lisati 30  $\mu\text{l}$  homogenaati. Järgnevalt proove inkubeeriti 5 min  $37^\circ\text{C}$  juures ning mõõdeti neeldumine spektrofotomeetril 540 nm juures. PBS-ga töödeldud lüsaadi tulemus ehk vaba glütserooli väärtus lahutati triglütseriidide reagendiga töödeldud lüsaadi väärtusest, mille tulemusena saadi TAG-de koostises olnud glütserooli kogus.

### 2.2.5 Bradford

Bradford'i meetod on kiire ja täpne spektroskoopiline analüütiline protseduur, mida kasutatakse valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks lahuses. Meetod põhineb värvaine Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) seondumisel aromaatsete ja aluseliste aminohappe jääkidega. CBBG reageerib arginiini ja hüdrofoobsete aminohappe jääkidega, moodustades sinist värvi kompleksi valguga. Meetodi abil on võimalik määrata valgu kontsentratsiooni vahemikus 100-1,500  $\mu\text{g/ml}$ . Kuna CBBG kontsentratsioon on tunduvalt suurem valgu kontsentratsioonist, siis suureneb lahuse absorptsiooni 590 nm piirkonnas võrdeliselt valgu kontsentratsiooniga. Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks kanti 2  $\mu\text{l}$  kuumtöödeldud homogenaati 96-kohalisele mikroitiiterplaadile koos 200  $\mu\text{l}$  Bradford'i reagendiga. Proove inkubeeriti 5 min  $37^\circ\text{C}$  juures ning mõõdeti absorptsiooni 595 nm juures.

### 2.2.6 Kompleks II aktiivsuse mõõtmine

Suktsinaadi dehüdrogenaas on mitokondriaalses hingamisahelas kompleks II, mis kannab elektrone suktsinaadilt ubikvinoonile ja oksüdeerib suktsinaati fumaraadiks. SDH mõõtmiseks kasutasin BioVisioni poolt toodetud katsesüsteemi (kataloogi number K660), mis baseerub SDH aktiivsuse tulemusena suktsinaadi fumaraadiks konverteerumise käigus elektroni kandmisel proovile põhjustatud värvuse kadumist. Selleks prepareerisin *Drosophila*-te lüsaadi järgmiselt: 10 isast kärbest homogeniseeriti uhmrinuiaga 100 µl katse puhvris ning saadud proove inkubeeriti 10 minutit jääl. Peale seda tsentrifuugiti proove 5 minuti jooksul lauatsentrifuugis 10.000 x g juures ning saadud pandi uude katsutisse. Edasi SDH mõõtmiseks kanti 96-mikroitiiterplaadile 40 µl katse puhvrit, millele lisati 10 µl lüsaati ning 50 µl reaktsiooni puhvrit (SDH Assay Buffer – 644 µl + SDH Substrate Mix – 28 µl + SDH Probe – 28 µl). Spektrofotomeetri abil mõõdeti SDH aktiivsust 600 nm ja 25°C juures tunni aja jooksul kaheminutiliste intervallidega

### 2.2.7 Mitokondriaalse fraktsiooni puhastamise meetodika

Proovide ettevalmistamiseks koguti ligikaudu 100 kärbest pudelisse ning inkubeeriti jää peal kuni kärbsed enam ei liigu. Edasi pandi nad potselanuhmrisse jääl 4°C toas ning homogeniseeriti ettevaatlikult uhmrinuiaga 500 µl isolatsiooni puhvris. Saadud lüsaati filtreeriti läbi nailonvõrgu, et eraldada suuremaid koe- ja kutiikulate fragmente. Edasi tsentrifuugiti lüsaati 10 minuti jooksul 300 x g ja 4°C juures. Mitokondrid eraldati supernatandist 10 minutilise tsentrifuugimisega 4°C ja 8.000 x g juures. Mitokondriaalset sadet pesti 2x isolatsioonipuhvriga ja tsentrifuugiti nagu algsel mitokondrite sadestamisel.

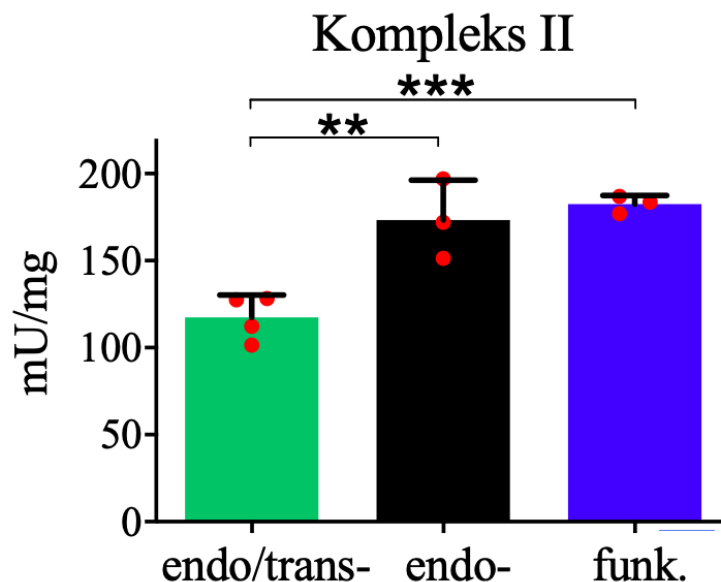
### 2.2.8 Statistiline analüüs

Kõikide katsete puhul kasutati 4-5 bioloogilist kordust ning tulemuste statistilist relevantsust kontrolliti läbi kahe-suunalise t-testi analüüsi. p-väärtuste tähiseid on järgmised: ns – statistiliselt mitterelevante vahe, \* p<0.05; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001. Graafikutel esitatud punased täpid tähistavad individuaalseid mõõtmistulemusi ja usalduspiirid tähistavad standardhälvet. Keskmise eluea erinevuste vahelised p-väärtused arvutati selleks ettenähtud

analüüsiprogrammi OASIS2 abil (Han jt., 2016) Tulemused analüüsiti nii Excelis kui GraphPad Prism 6 programmidega ning graafikud koostati GraphPad Prism 6 programmiga.

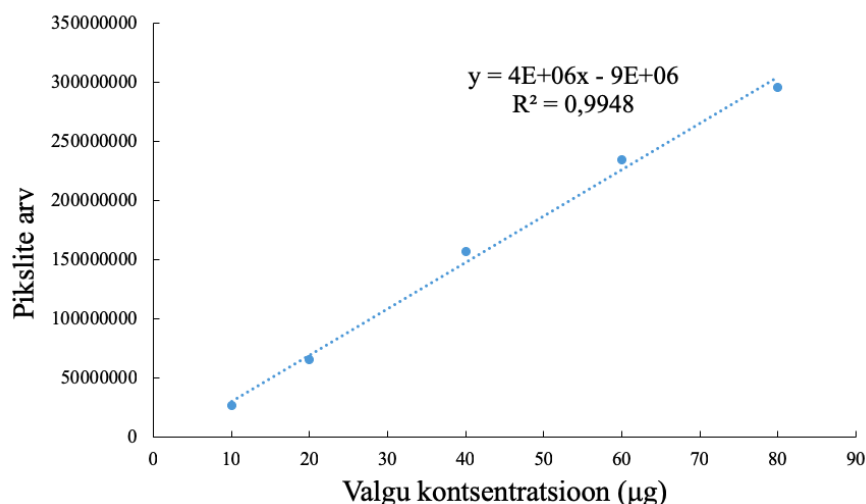
### 2.3 Tulemused ja arutelu

Töös kasutasin *D. melanogaster*'i tüvesi, mis kannavad P-elementide ja phiC31 süsteemi abil integreeritud GAL4-UAS süsteemi kontrolli all mitokondriaalse signaaljärjestusega liidetud kõiki kolme bakteriaalse endonukleaasi EcoBI subühiku geeni (*HsdM*, *HsdS* ja *HsdR*) (vt. Tabel 3). Meie töögrupp on eelnevalt näidanud, et seeläbi häiritud *Drosophila* mitokondriaalne homöostaas ei põhjusta mtDNA olulist fragmentatsiooni ega RC defekti, küll aga rasvavarude disproportsionaalselt kiiremat vähenemist võrreldes süsivesikute varudega (Bahhir jt., 2019). Sellega kaasnes ka hingamisahela kompleks I aktiivsuse tõus. Nagu kirjanduslikus osas kirjeldatud, sisenevad elektronid hingamisahelasse läbi komplekside I ja II vastavalt NADH ja FADH<sub>2</sub> abil. Viimast neist toodetakse enamasti TCA tsükli, seega peaks juhul kui katabolism on ümber korraldunud eelistatult rasvade oksüdatsioonile (mida utiliseeritakse erinevalt süsivesikutest vaid TCA tsükli kaudu), peaks sellega eeldatavalt kaasnema ka kompleks II aktiivsuse tõus. Kontrollimaks seda hüpoteesi, mõõtsin kompleks II ehk SDH aktiivsust 6-ndal päeval pärast mtEcoBI ekspressiooni algust täiskasvanutel *Drosophila*'tel (vt. Joonis 6). Nagu antud jooniselt näha, on aktiivsus tõusnud, mis viitab sellele, et süsivesikute tarbimise blokeerimise tõttu on mitokondriaalne metabolism ümber korraldunud rasvade oksüdatsioonile, samas kui mitokondriaalse katabolismi võimekus ei ole langenud.

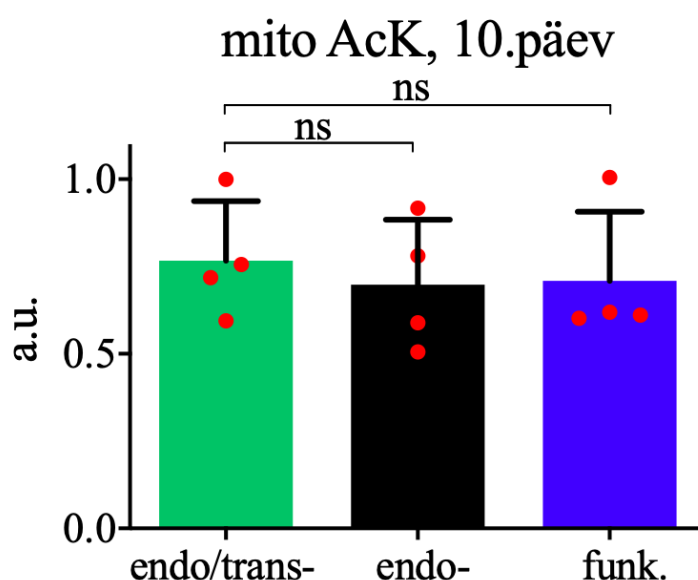


**Joonis 6. Kompleks II aktiivsus *tubGS>mtEcoBI* tüvedes.** Aktiivsuse tase 6.päeval on näidatud pärast indutseerimist söötmesse 200  $\mu$ M mifepristooni.  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Selline metaboolse jäikuse teke oli ootamatu, eriti seetõttu, et *Drosophila* on evolutsioneerunud tarbima enamasti süsivesikuid. Põhjuste analüüs meie töögrupis oli eelnevalt näidanud Akt kinaasi inaktivatsiooni vastusena funk. mtEcoBI ekspressioonile (Bahhir jt., 2019). See kinaasi on tsentraalse tähtsusega süsivesikute viimisel rakku ning selle protsessi inhibitsioon põhjustab näit. tüüp II diabeeti (Zdychova ja Komers, 2005). Huvitaval kombel ei põhjustanud seda endo-mtEcoBI, kuigi ka selles tüves oli täheldatav metaboolse paindumatuse teke (Bahhir jt., 2019). Seega peab eksisteerima ka teine, Akt inaktivatsioonist erinev mehhanism. Nagu eelpool mainitud, on mitokondri mitmete metaboliitide allikas, mis reguleerivad PTM-de ja epigeneetika kaudu raku üldist metabolismi. Kuna varasemalt oli täheldatud mtDNA stressi ja AcCoA konsentratsiooni seos valkude atsetülatsiooniga (Martinez-Reyes jt., 2016), kvantifitseerisime antud PTM-de hulka western blotil. Tagamaks usaldusväärseid kvantifitseerimise andmeid olin eelnevalt defineerinud valgu kontsentratsiooni ja Ponceau S signaali lineaarse suhte (Joonis 7). *Drosophila tubGS>mtEcoBI* tüvede mitokondriaalse valgufraktsiooni atsetülatsioon tase 10. päeval on toodud joonisel 8. Jooniselt on näha, et 200  $\mu$ M mifepristooni kontsentratsioonil ei ole mitokondriaalse valgufraktsiooni atsetülatsioon muutunud.



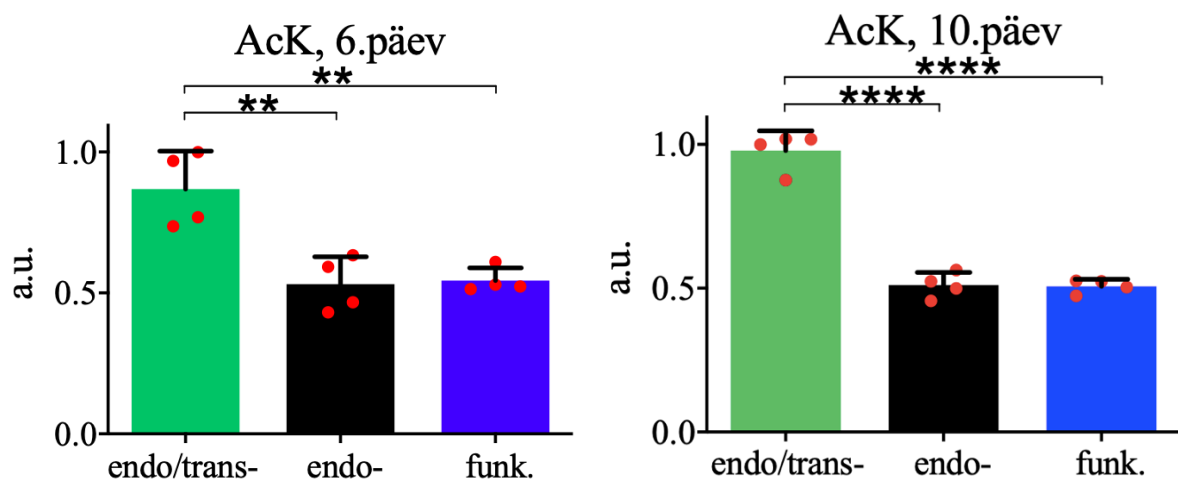
**Joonis 7.** Ponceau S-värvitud valgusignaali densitomeetria kõver nitrotselluloosil.



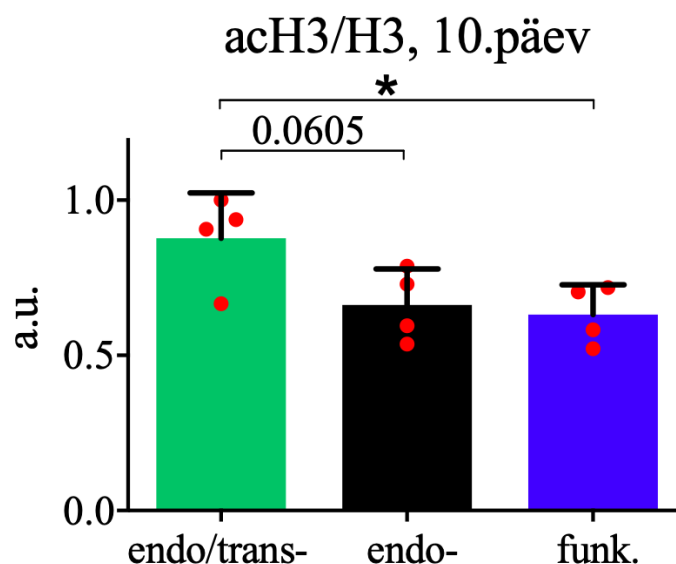
**Joonis 8.** *tubGS>mtEcoBI* mitokondriaalse fraktsiooni atsetülatsiooni tase 10.päeval. Atsetülatsiooni tase on näidatud pärast indutseerimist söötmesse 200 µM mifepristooni. ns – (not significant) – statistiliselt mitterelevante vahe.

Pärast seda kontrollisin ka üldist valkude atsetülatsiooni taset (vt. Joonis 9). Nagu antud jooniselt näha, 200 µM mifepristooni kontsentratsioonil *tubGS>mtEcoBI* tüve üldine atsetülatsiooni tase on vähenenud nii 6. kui ka 10. päeval. See viitab otseselt sellele, et väljaspool mitokondrit on toimunud oluline valkude atsetülatsiooni vähenemine. Selle PTM-i vormi taset reguleeritakse kahe vastasmõjulise protsessi, atsetüleerimise ja deatsetüleerimise poolt. Metaboolseid ensüüme deatsetüleerivad enamasti sirtuiinide perekonna valgud, mistõttu on nad pälvinud ka palju tähelepanu metaboolsete haiguste põhjuste uuringutel (vt. „Mitokonder kui metabolismi regulaator“; Houtkooper jt., 2012). Samas reguleerivad histoonide atsetülatsiooni taset teised, sirtuiinidest erineva perekonna valgud. Kuna pole selge, kumb protsess põhjustab

ekstramitokondriaalsete valkude atsetülatsiooni taseme vähenemist, analüüsisin ka histoon 3 neljanda lüsiini spetsiifilist atsetülatsiooni (vt. Joonis 10), mis oli samuti vähenenud. Kuna on keeruline näha, kuidas oleks samaaegselt aktiveerunud erinevad deatsetülaasid, on selle fenomeni põhjuseks pigem defektne atsetülatsioon. Kuna AcCoA on universaalne doonor kõikide valkude atsetülatsiooni reaktsioonide korral, on see fenomen tõenäoliselt põhjustatud tsütosoolse AcCoA taseme langusest väljaspool mitokondrit.

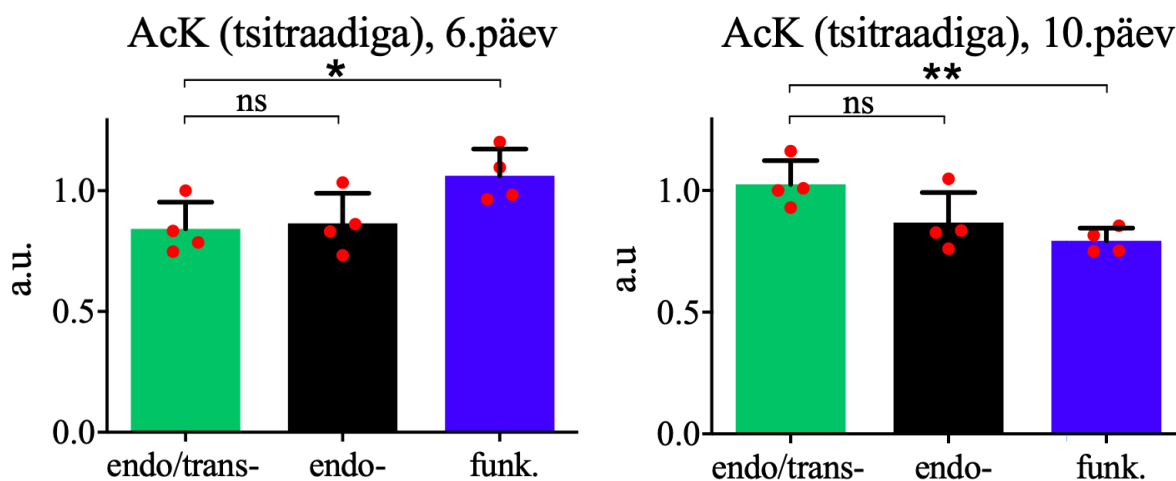


**Joonis 9.** *tubGS>mtEcoBI* üldine atsetülatsiooni tase 6. ja 10.päeval. Atsetülatsiooni tase on näidatud pärast indutseerimist söötmesse 200  $\mu$ M mifepristooni.  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*), ns – (not significant) – statistiliselt mitterelevante vahe.



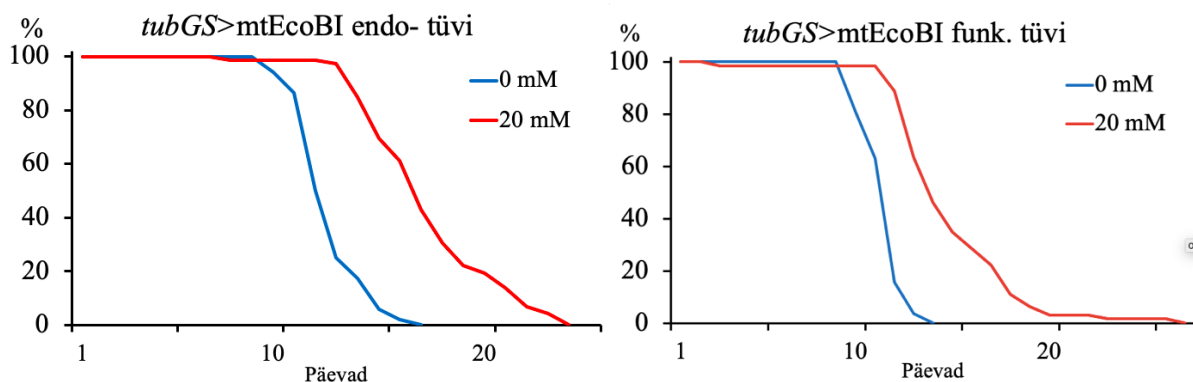
**Joonis 10.** *tubGS>mtEcoBI* histooni 3 atsetülatsiooni tase 10.päeval. Atsetülatsiooni tase on näidatud pärast indutseerimist söötmesse 200  $\mu$ M mifepristooni.  $p < 0,05$  (\*).

Nagu imetajates, ei transpordita ka *Drosophila* 'tes mitokondriaalset AcCoA-d tsütosooli otse, vaid läbi tsitraadis süstiku, mistõttu reguleerib tsütosoolselt AcCoA-d tsitraadi kontsentratsioon ja/või transport. Transpordi vähenemine tsütosooli omab *Drosophila* 'l otsest mõju histoonide atsetülatsioonile ja seeläbi tuuma DNA stabiilsusele (Morciano jt., 2009). Tsitraadi kontsentratsiooni tsütosoolis on aga võimalik tõsta, tõstes tsitraadi kontsentratsiooni toidus. Seepärast kontrollisin valkude atsetülatsiooni muutusi *Drosophila tubGS>mtEcoBI* tüvedes söötmel, mis sisaldas lisaks MP-le ka 20 mM naatriumtsitraati (vt. Joonis 11). Tulemustest on näha, et 6.päeval atsetülatsiooni tasemes vähenemist ei ole ning kuigi 10.päeva ajapunktis oli atsetülatsioon endo- ja funk. tüvedes küll vähenenud võrreldes endo/trans- kontrolltüvega, kuid see oli tunduvalt vähem kui ilma tsitraadita söötme puhul. Seetõttu saab väita, et tsitraadi lisamise kaudu tsütosoolse AcCoA kontsentratsiooni tõstmisega saab kompenseerida mtEcoBI-st tingitud valkude atsetülatsiooni defekti.



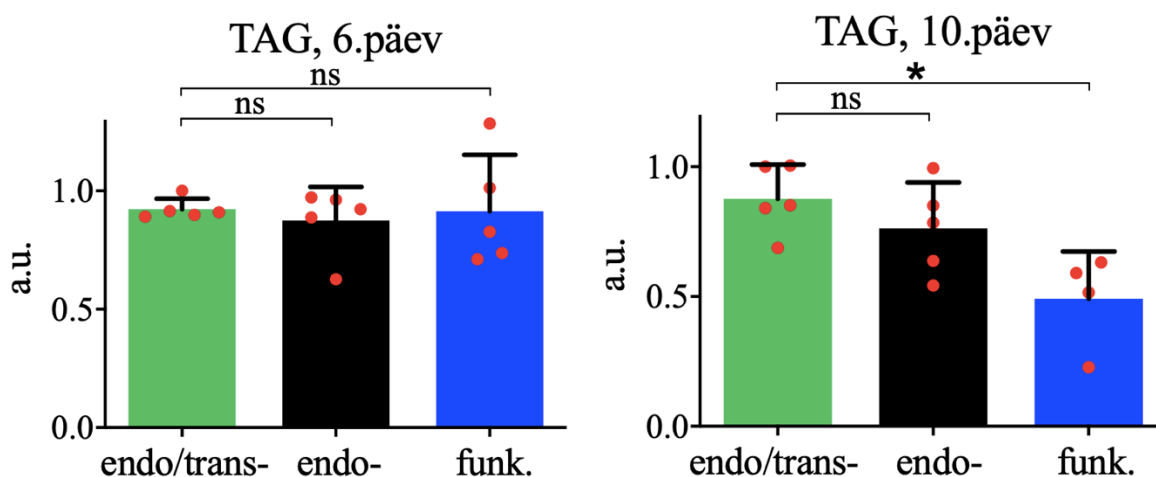
**Joonis 11.** *tubGS>mtEcoBI* üldine lüsiini atsetülatsiooni (AcK) tase 6. ja 10.päeval. Atsetülatsiooni tase on näidatud pärast indutseerimist söötmesse 200  $\mu$ M mifepristooni ja 20 mM naatriumtsitraadi.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*), ns – (not significant) – statistiliselt mitterelevante vahe.

Siiski oli ebaselge, kas antud fenomen on ka seotud süsivesikute tarbimise inhibitsiooniga ja kas selle lisamine omab positiivset mõju ka mtEcoBI versioone kandavate *Drosophila* tüvede elulemusele ja metabolismile. Selleks analüüsisin tsitraati sisaldaval söötmel *tubGS>mtEcoBI* tüvedele elulemust (vt. Joonis 12). Joonisel on näha, et kontsentratsioonil 20 mM pikendab märkimisväärselt keskmist eluiga nii endo- kui ka funk. tüve puhul.



**Joonis 12.** *tubGS>mtEcoBI* endo- ja funktsionaalsete *Drosophila* tüvede eluiga. *Drosophila*'te isaste suremus 200  $\mu$ M mifepristooni ja 20 mM naatriumtsitraadi kontsentratsioonidega söötmel. Keskmise eluea erinevuste p-väärtused; endo- normaalne vs. tsitraadiga sööde:  $p < 0.001$ , funk- normaalne vs. tsitraadiga sööde:  $p < 0.001$ .

Lisaks sellele analüüsisin ka triatsüülglütseriidide taset (vt. Joonis 13). Tulemuste põhjal on selge, et TAG-de taseme vähenemine on palju vähem järsk kui ilma tsitraadita söötmel (võrdle Joonis 12 vs. joonis 2A Bahhir jt., 2019). Seega saab väita, et tsitraadi lisamisega saab teatud ulatuses kompenseerida *mtEcoBI* ekspressioonist põhjustatud atsetülatsiooni vähenemist, lühenenud eluiga ja TAG-de kadumise kiirust. See omakorda viitab sellele, et need protsessid on omavahel seotud ja üks fenomen põhjustab teisi.



**Joonis 13.** *tubGS>mtEcoBI* triatsüülglütseriidide tase 6. ja 10.päeval. TAG-de tase on näidatud pärast indutseerimist söötmesse 200  $\mu$ M mifepristooni ja 20 mM naatriumtsitraadi.  $p < 0.05$  (\*), ns – (not significant) – statistiliselt mitterelevante vahe.

Atsetülatsiooni taseme langust, eriti tänu sirtuiinide aktivatsioonile, on kirjeldatud eelkõige kui metaboolset paindlikust suurendavat nähtust, mis oma positiivset efekti mitmesuguste metabolismi patoloogiate korral (Houtkooper jt., 2012). Kuid sirtuiinide deatsetülatsiooni mõju



piirdub vaid teatud atsetüleeritud valkude osaga ning ei mõjuta kõikide valkude atsetülatsiooni, näit. histoonide oma. AcCoA kontsentratsioon mõjutab aga absoluutselt kõiki atsetülatsiooni reaktsioone, ka histoonide puhul. Oluline on tähele panna, et atsetülatsiooni defekt kaasnes nii funk kui ka endo- mtEcoBI ekspressiooniga ning oli nende kahe tüve puhul identne, mistõttu erinevalt Akt inaktivatsioonist ei ole tsütونukleaarne atsetülatsiooni vähenemine tingitud mtEcoBI poolt põhjustatud mtDNA degradatsioonist ning Akt-i inhibitsioon ei kontribueeri oluliselt atsetülatsiooni defekti. Nagu eelpool kirjeldatud, on endo- mtEcoBI võimeline translokeerima mtDNA-d, mille tulemusena muutub tema topoloogia (Bahhir jt., 2019). See aga omab suure tõenäosusega negatiivset efekti mtDNA stabiilsusele *in vivo*, kuna muudab ja häirib nukleoidide sisemist struktuuri. Kuigi varajasemalt on täheldatud mtDNA defekti, AcCoA kontsentratsiooni ja valkude atsetülatsiooni seost (Martinez-Reyes jt., 2016), siis antud juhul oli tegemist massiivse mtDNA kaoga, mille tulemusena tekkis tugev RC ja TCA tsükli defekt. Meie süsteemi puhul on mitokondriaalse defekti signatuur teine: mtDNA degradatsioon on vähene ja ei mõjuta RC efektiivsust. Vastupidi, nagu oleme näidanud, on kompleks I ja II aktiivsus tõusnud. Seega põhjustab mtEcoBI translokatsiooniline aktiivsus atsetülatsiooni defekti läbi mehhanismi, mis ei ole otseselt seotud OXPHOS-ga. Kuigi nukleoidide koostises on mitu metabolismiga seotud valku, on praeguseks kirjeldatud vaid ühte teadaolevat juhtumist pärmis, kus akonitaasi kaudu on seostatud nukleoidi koostise muutused metabolismiga. Hetkel ei ole meil piisavalt andmeid, et väita, milline muutus nukleoidides võiks olla antud atsetülatsiooni defekti põhjustajaks, kuid üheks potentsiaalseks kandidaadiks võiks olla fosfoenolpüruvaadi karboksükinaas 2 ehk PEPCK2. Seda valku on kirjeldatud nukleoidide koostises ning ta võib olla otseses kontaktis mtDNA-ga (Hakimi jt., 2007). PEPCK on peamiseks glükoneogeneesi kiirust reguleerivaks ensüümiks. Glükoneogeenes on glükolüüsile vastassuunaline metaboolne rada ning põhjustab glükoosi sünteesi mitterahhahhariidsetest eelainetest. Nende kahe raja aktiivsuse ja regulatsioon on vastassuunaline, kui rakus on üks rada suhteliselt inaktiivne, siis teine on väga aktiivne (Berg jt., 2002).

Kuigi enamik glükolüütilisi etappe on pöörduvad, on püruvaadi kinaasi poolt katalüüsitud reaktsioon pöördumatu. Fosfoenolpüruvaati ei toodeta seega mitte otse püruvaadist vaid oksaloatsetaadist ning seda protsessi katalüüsib PEPCK1, mis seetõttu limiteerib ka ülejäänud raja kiirust. Sellel ensüümil on kaks isovormi, tsütопlasmaatiline ja mitokondriaalne (vastavalt PEPCK1 ja PEPCK2). Tsütопlasmaatiline vorm on otseselt reguleeritud atsetülatsiooni poolt; nimelt degradeeritakse atsetüleeritud PEPCK1 kiirelt, samas kui atsetülatsiooni puudumine stabiliseerib ensüümi ja tõstab seeläbi tema aktiivsust (Jiang jt., 2011). Peale selle tõstab PEPCK1 rohke atsetüleeritus tema anaplerootilist aktiivsust ja represseerib osalust glükoneogeneesis (Latorre-Muro jt., 2018). Seetõttu on võimalik hüpoteetiline interaktsioon

mtDNA stressi ja süsivesikute tarbimise vahel läbi PEPCK ensüümi isovormide. Eeldades, et nukleoidi arhitektuuri muutused aktiveerivad PEPCK2 aktiivsust, eemaldades näiteks mtEcoBI translokatsioonilise aktiivsuse tulemusena teda mtDNA-lt, suurendab see glükoneogeneesi ja represserib glükolüüsi. See tuntakse ära organismi poolt kui “näljasignaal”, mille tulemusena inhibeeritakse tsitraadi transporti tsütoplasmasse ja põhjustatakse valkude atsetülatsiooni langust. See omakorda aktiveerib tsütoplasmaatilist PEPCK-d, suurendades veelgi glükoneogeneesi aktiivsust/glükolüüsi repressiooni. Hetkel on selline küll puhtalt teoreetiline, kuid meile teadaolevatel andmetel siiski reaalne võimalus metaboolse tasakaalu muutusteks läbi mtDNA stressi. Siiski ei saa me välistada ka teiste mitokondriaalsete valkude ja – komplekside aktiivsuste spetsiifilist muutust vastusena mtDNA stressile. Näiteks tsitraadi transpordi kompleksi selektiivse inhibitsiooniga on võimalik vähendada histoonide atsetüleerituse taset *Drosophila*’s, mis põhjustab genoomi ebastabiilsust (Morciano jt., 2009). Antud stsenaariumi korral käivituks muidugi ka eelnevale kirjeldatud PEPCK1-st sõltuv metaboolne tasakaalu muutus rasvade oksüdatsiooni suunas.

Sõltumata täpsest mehhanismist kirjeldab käesolev töö ekstramitokondriaalsete valkude atsetülatsiooni defekti kui peamist põhjust, miks toimub *Drosophila* mudelsüsteemis metaboolne tasakaalu muutus vastusena mtDNA stressile. Selline ootamatu seos mtDNA stabiilsuse ja globaalse metabolismi vahel ilma OXPHOS kontributsioonita laiendab oluliselt meie arusaamist mtDNA rollist ka selliste metaboolsetele haiguste nagu rasvumine ja diabeet tekkel.

## KOKKUVÕTTE

Mitokonder on eukarüootse raku organell, mis vastutab mitmete rakule eluliselt oluliste funktsioonide eest. Mitokondri peamiseks ülesandeks peetakse ATP tootmist OXPHOS teel, omades peale selle ka tähtsaid rolle apoptoosil, raku ainevahetuse reguleerimisel, kaltsiumi homöostaasi säilitamisel, signaaliülekanDES jne.

Mitokondreid on uuritud juba pikka aega - eesmärgiga mõista nii raku metabolismi kui ka mitokondriga seostuvaid haigusi nagu näiteks diabeet, epilepsia, müopaatia, Alzheimeri ja Parkinsoni tõved jne. Klassikalise ettekujutise järgi mitokondriaalsetest defektidest tulenevate haiguste tekke peamiseks põhjuseks on siiani peetud ROS-ide üleproduktsooni ning ATP sünteesi efektiivsuse langust. Kuid häired mitokondriaalsel funktsioonil, nagu näiteks mtDNA ebastabiilsus ei pruugi põhjustada ainult neid defekte, vaid ka muid metaboolseid ümberkorralduste organismis.

Käesolevas magistritöös uurisin uusi seoseid mitokondriaalse stressi ja metaboolsete defektide tekke vahel *Drosophila melanogaster*'is. Meie töögruppi varasemad andmed on näidanud, et häiritud *Drosophila* mitokondriaalne homöostaas ei põhjusta hingamisahela defekti ja ROS-de produktsioon jääb normaalseks ning katabolismi allikana eelistatult kasutatakse lipiide võrreldes süsivesikutega. Töö alguses kinnitasin katabolismi tasakaalu muutust SDH aktiivsuse mõõtmisega täiskasvanutel kärbestel. Kuna eelnevalt on kirjeldatud mitokondriaalse RC funktsiooni ja AcCoA konsentratsooni omavahelist seost, analüüsisin AcCoA kontsentratsiooni vähenemisest tulenevat võimalikku muutusi valkude atsetülatsioonis. Meie tulemuste kohaselt põhjustab indutseeritud mtDNA stress valkude atsetülatsiooni märkimisväärtset vähenemist väljaspool mitokondrit. See on ka üheks põhjuseks, miks metaboolne tasakaal on nihkunud rasvade utiliseerimise suunas, kuna valkude deatsetülatsiooni inhibeerimine läbi eksogeense AcCoA prekursori lisamise pikendas mtEcoBI poolt põhjustatud lühenenud eluiga ja pidurdas rasvavarude vähenemist. Kuna valkude atsetülatsiooni vähenemine oli identne nii täisfunktsionaalse kui ka vaid translokatsioonilist aktiivsust omava mtEcoBI puhul, on antud efekt seotud mtDNA translokatsiooniga mtEcoBI poolt, mis muudab nii mtDNA topoloogiat kui ka suure tõenäosusega lõhub nukleoidi *in vivo* struktuuri. Seega olen kirjeldanud esmakordselt seost mtDNA stabiilsuse ja PTM-de vahel, millega ei kaasne mtDNA fragmentatsioonist või vähenemisest tingitud RC defekti. Hetkel ei ole piisavalt andmeid kirjeldamiseks täpset mehhanismi, kuid teoreetiliselt võiks selline efekt olla seotud PEPCK-ga, mis on nukleoidi koostises esinev glükoneogeneesi kiirust määrav ensüüm. Võimalik aktiivsuse muutus, mis võib tuleneda nukleoidi ümberkorraldusest ja/või kontakti kadumisest PEPCK ja

mtDNA vahel, võiks teoreetiliselt suurendada glükoneogeneesi, represseerida glükolüüsi ja vähendada valkude atsetüleeritust läbi tsütosoolse tsitraadi vähenemise. Minu tulemused kirjeldavad esmakordselt uutset seost mtDNA stabiilsuse ja globaalse metabolismi vahel ilma OXPHOS-i kontributsioonita ning avavad uue uurimissuuna, mis võib selgitada siiani selgusetuks jäänud metaboolsete haiguste nagu diabeet ja rasvumine tekkepõhjuseid.

## SUMMARY

Mitochondria play a critical role in the generation of metabolic energy in eukaryotic cells. The main function of mitochondria is to produce ATP via oxidative phosphorylation. In addition to that, mitochondria play an important role in apoptosis, regulation of cellular metabolism, calcium homeostasis, signal transduction etc.

Mitochondria have been studied for a long time - to understand the details of cellular metabolism as well as diseases with contribution from disturbed mitochondrial function such as diabetes, epilepsy, myopathy, Alzheimer's and Parkinson's and others. The main causes of mitochondrial diseases are generally thought to be caused by the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and the reduction in synthesis efficiency of ATP. However, mitochondrial dysfunction, caused for example by mitochondrial DNA instability do not always produce only these defects, but also can lead to other metabolic changes in an organism.

In this thesis, I explored a new links between mitochondrial DNA stress and metabolic defects in *Drosophila melanogaster*. During previous work our research group has discovered that disturbed *Drosophila* mitochondrial DNA stability by mitochondrially-targeted bacterial endonuclease EcoBI does not cause defects of the mitochondrial respiratory chain, production of ROS remains normal and that lipids are preferably used as a source of catabolism compared to carbohydrates. At the beginning, I confirmed changes in the balance of catabolism by measuring the activity of SDH or complex II in flies with adult-onset expression of mtEcoBI. Since a link between the mitochondrial RC function and AcCoA concentration has been previously described, I analyzed the possible changes in the acetylation of proteins due to decreased AcCoA concentration. According to our results, induced mtDNA stress causes a significant reduction of acetylation of proteins outside the mitochondria. This is also one of the reasons why the metabolic balance has shifted towards fat utilization, as inhibition of deacetylation of proteins through the addition of exogenous AcCoA precursor prolonged lifespan caused by mtEcoBI and inhibited depletion of lipids. Since the decrease in acetylation of proteins was identical in both fully functional and translocation activity of mtEcoBI, this effect is associated with mtDNA translocation by mtEcoBI, which modifies the mtDNA topology and with high probability disrupts *in vivo* the structure of the nucleoid. Thus, for the first time, I have described link between mtDNA stability and protein posttranslational modification that do not involve fragmentation or loss of mtDNA leading to RC defect. At the moment, there is not enough data to describe exact mechanism, but theoretically, this effect

could be related to PEPCK because it is the main enzyme that regulates the rate of glyconeogenesis and also a component in nucleoids. A possible change in activity that may result from nucleoid rearrangement and/or loss of contact between PEPCK and mtDNA could theoretically increase gluconeogenesis, repress glycolysis and reduce the acetylation of proteins through reduction of cytosolic citrate. My results describe for the first time the novel link between stability of mtDNA and global metabolism without the contribution of OXPHOS and it opens up a new direction of research, which can explain the causes of metabolic diseases such as diabetes and obesity.

## **TÄNUAVALDUSED**

Sooviksin siiralt tänada enda juhendajat Priit Jõersi tema meisterliku õpetamise, kogemuse jagamise ja suure abivalmiduse eest. Lisaks tahan ka tänada kogu Molekulaarbioloogia ja Biokeemia laborite kollektiivi sõbraliku keskkonna eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Ahlqvist, K. (2015). The effects of mitochondrial DNA mutagenesis on somatic stem cells and ageing.

Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., ... & Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic acids research*, 31(6), 1640-1645.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., & Roberts, K. (2002). Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition.

Alves, T. C., Pongratz, R. L., Zhao, X., Yarborough, O., Sereda, S., Shirihai, O., ... & Kibbey, R. G. (2015). Integrated, step-wise, mass-isotopomeric flux analysis of the TCA cycle. *Cell metabolism*, 22(5), 936-947.

Ashburner, M., Golic, K. G., ja Hawley, R. S. (2005) *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bahhir, D., Yalgin, C., Ots, L., Järvinen, S., George, J., Naudí, A., Krama, T., Krams, I., Tamm, M., Andjelković, A., Dufour, E., Gonzales de Cosar, J., Gerards, M., Parhiala, M., Pamplona, R., Jacobs, H.T., Jõers, P. (2019). mtDNA stress reprograms metabolism via cytonuclear protein modifications and Akt deactivation. *PLoS Genetics*, nõutud paranduste siseseviimisel.

Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *cell*, 120(4), 483-495.

Bao, X. R., Ong, S. E., Goldberger, O., Peng, J., Sharma, R., Thompson, D. A., ... & Goessling, W. (2016). Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *Elife*, 5, e10575.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Gluconeogenesis and glycolysis are reciprocally regulated. *Biochemistry*.

Berk, A., Zipursky, S., & Lodish, H. (2000). Molecular Cell Biology 4th edition.



- Berquist, B. R., Canugovi, C., Sykora, P., Wilson III, D. M., & Bohr, V. A. (2012). Human Cockayne syndrome B protein reciprocally communicates with mitochondrial proteins and promotes transcriptional elongation. *Nucleic acids research*, 40(17), 8392-8405.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., & Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific  $\phi$ C31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3312-3317.
- Bogenhagen, D. F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9-10), 914-920.
- Bogenhagen, D. F., Rousseau, D., & Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3665-3675.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development*, 118(2), 401-415.
- Brock, T. (2011). Protein acetylation: much more than histone acetylation. *Cayman*, 2011, 1-3.
- Campbell, G. E. (2014). Investigating the mechanism of clonal expansion of deleted mtDNA species.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 79-99.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology*, 160(2), 189-200.
- Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., & Butow, R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 307(5710), 714-717.

Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., & Schon, E. A. (1995). Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *American journal of human genetics*, 57(2), 239.

Chol, M., Lebon, S., Benit, P., Chretien, D., De Lonlay, P., Goldenberg, A., ... & Rustin, P. (2003). The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *Journal of medical genetics*, 40(3), 188-191.

Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E., & Mann, M. (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 536.

Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edn. The Cell: A Molecular Approach. Sunderland, MA.

Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W., & Arnheim, N. (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7370-7374.

del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., & Desplan, C. (2012). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nature methods*, 9(1), 47.

Demerec, M., & Kaufmann, B. P. (1986). *Drosophila guide: introduction to the genetics and cytology of Drosophila melanogaster* (No. 575: 595.77 DEM).

Di Re, M., Sembongi, H., He, J., Reyes, A., Yasukawa, T., Martinsson, P., ... & Fersht, A. R. (2009). The accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  determines the DNA content of mitochondrial nucleoids in human cultured cells. *Nucleic acids research*, 37(17), 5701-5713.

Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1372-1401.

- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *genesis*, 34(1-2), 1-15.
- Escobar-Henriques, M., & Anton, F. (2013). Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: tubulation vs. fragmentation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(1), 162-175.
- Fan, J., Krautkramer, K. A., Feldman, J. L., & Denu, J. M. (2015). Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS chemical biology*, 10(1), 95-108.
- Fish, M. P., Groth, A. C., Calos, M. P., & Nusse, R. (2007). Creating transgenic *Drosophila* by microinjecting the site-specific  $\phi$ C31 integrase mRNA and a transgene-containing donor plasmid. *Nature protocols*, 2(10), 2325.
- Fisher, R. P., & Clayton, D. A. (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy-and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 260(20), 11330-11338.
- Frezza, C. (2017). Mitochondrial metabolites: undercover signalling molecules. *Interface Focus*, 7(2), 20160100.
- Galdieri, L., Zhang, T., Rogerson, D., Lleshi, R., & Vancura, A. (2014). Protein acetylation and acetyl coenzyme a metabolism in budding yeast. *Eukaryotic cell*, 13(12), 1472-1483.
- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., & Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a011080.
- Goffart, S., Cooper, H. M., Tyynismaa, H., Wanrooij, S., Suomalainen, A., & Spelbrink, J. N. (2008). Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and *in vivo* mtDNA replication stalling. *Human molecular genetics*, 18(2), 328-340.

- Hakimi, P., Yang, J., Casadesus, G., Massillon, D., Tolentino-Silva, F., Nye, C. K., ... & Johnson, D. H. (2007). Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32844-32855.
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: a primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*, 201(3), 815-842.
- Han, S. K., Lee, D., Lee, H., Kim, D., Son, H. G., Yang, J. S., ... & Kim, S. (2016). OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*, 7(35), 56147.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M., & Spelbrink, J. N. (2014). To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*, 100, 219-226.
- Hewitt, V. L., & Whitworth, A. J. (2017). Mechanisms of Parkinson's disease: Lessons from *Drosophila*. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 121, pp. 173-200). Academic Press.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 225.
- Hudson, G., & Chinnery, P. F. (2006). Mitochondrial DNA polymerase- $\gamma$  and human disease. *Human molecular genetics*, 15(suppl\_2), R244-R252.
- Hutson, S. M., Sweatt, A. J., & LaNoue, K. F. (2005). Branched-chain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *The Journal of nutrition*, 135(6), 1557S-1564S.
- Iborra, F. J., Kimura, H., & Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*, 2(1), 9.
- James, A. M., Yau-Huei, W. E. I., Cheng-Yoong, P. A. N. G., & MURPHY, M. P. (1996). Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochemical Journal*, 318(2), 401-407.

Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., ... & Zhao, S. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Molecular cell*, 43(1), 33-44.

Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P., & Shoubridge, E. A. (2007). The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Molecular biology of the cell*, 18(9), 3225-3236.

Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M., & Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal*, 23(12), 2423-2429.

Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A. C., Geula, C., Kowall, N. W., & Khrapko, K. (2006). Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature genetics*, 38(5), 518.

Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*, 13(1), 89.

Latorre-Muro, P., Baeza, J., Armstrong, E. A., Hurtado-Guerrero, R., Corzana, F., Wu, L. E., ... & Denu, J. M. (2018). Dynamic acetylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase toggles enzyme activity between gluconeogenic and anaplerotic reactions. *Molecular cell*, 71(5), 718-732.

Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A., & Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of cell science*, 117(13), 2653-2662.

Lewis, S., Hutchison, W., Thyagarajan, D., & Dahl, H. H. M. (2002). Clinical and molecular features of adPEO due to mutations in the Twinkle gene. *Journal of the neurological sciences*, 201(1-2), 39-44.

Lin, Y. Y., Lu, J. Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., ... & Berger, S. L. (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell*, 136(6), 1073-1084.

- Manwaring, N., Jones, M. M., Wang, J. J., Rochtchina, E., Howard, C., Mitchell, P., & Sue, C. M. (2007). Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion*, 7(3), 230-233.
- Markow, T. A. (2015). The natural history of model organisms: the secret lives of *Drosophila* flies. *Elife*, 4, e06793.
- Martinez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C. T., ... & Dufour, E. (2016). TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Molecular cell*, 61(2), 199-209.
- Medina, M. A. (2001). Glutamine and cancer. *The Journal of nutrition*, 131(9), 2539S-2542S.
- Mew, N. A., Pappa, M. B., & Gropman, A. L. (2015). Urea Cycle Disorders. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)* (pp. 633-647).
- Mews, P., Donahue, G., Drake, A. M., Luczak, V., Abel, T., & Berger, S. L. (2017). Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory. *Nature*, 546(7658), 381.
- Meyer, J. N., Leuthner, T. C., & Luz, A. L. (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, 391, 42-53.
- Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and cellular endocrinology*, 379(1-2), 62-73.
- Moraes, C. T., Shanske, S., Tritschler, H. J., Aprille, J. R., Andreetta, F., Bonilla, E., ... & DiMauro, S. (1991). mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *American journal of human genetics*, 48(3), 492.
- Morciano, P., Carrisi, C., Capobianco, L., Mannini, L., Burgio, G., Cestra, G., ... & Cenci, G. (2009). A conserved role for the mitochondrial citrate transporter Sea/SLC25A1 in the maintenance of chromosome integrity. *Human molecular genetics*, 18(21), 4180-4188.

- Muro, C., Grigoriev, S. M., Pietkiewicz, D., Kinnally, K. W., & Campo, M. L. (2003). Comparison of the TIM and TOM channel activities of the mitochondrial protein import complexes. *Biophysical journal*, 84(5), 2981-2989.
- Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(2), 412-434.
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H., & Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12596-12601.
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2), 411-436.
- Piazza, N., & Wessells, R. J. (2011). *Drosophila* models of cardiac disease. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 100, pp. 155-210). Academic Press.
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., & Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell metabolism*, 21(6), 805-821.
- Pirrotta, V. (1988). Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. In *Vectors* (pp. 437-456).
- Pitceathly, R. D. S., Rahman, S., & Hanna, M. G. (2012). Single deletions in mitochondrial DNA—molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. *Neuromuscular Disorders*, 22(7), 577-586.
- Prokop, A. (2013). A rough guide to *Drosophila* mating schemes. J. Roote ja A. Prokop (Eds.) *G*, 3, 353-358.
- Quiros, P. M., Prado, M. A., Zamboni, N., D'amico, D., Williams, R. W., Finley, D., ... & Auwerx, J. (2017). Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J Cell Biol*, 216(7), 2027-2045.
- Russell, O., & Turnbull, D. (2014). Mitochondrial DNA disease—molecular insights and potential routes to a cure. *Experimental cell research*, 325(1), 38-43.

- Sang, J. H. (2001). *Drosophila melanogaster*: the fruit fly. *Encyclopedia of genetics*, 157, 162.
- Schaefer, A. M., McFarland, R., Blakely, E. L., He, L., Whittaker, R. G., Taylor, R. W., ... & Turnbull, D. M. (2008). Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 63(1), 35-39.
- Sciacovelli, M., & Frezza, C. (2016). Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 175-181.
- Scialo, F., Sriram, A., Stefanatos, R., & Sanz, A. (2016). Practical recommendations for the use of the GeneSwitch Gal4 system to knock-down genes in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 11(8), e0161817.
- Scott, I., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in biochemistry*, 47, 85-98.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158-167.
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., ... & Santoro, L. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature genetics*, 28(3), 223.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., & Häring, H. U. (2017). Fibroblast growth factor 21—metabolic role in mice and men. *Endocrine Reviews*, 38(5), 468-488.
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 530.
- Suomalainen, A., & Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 77.



Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., & Kamata, T. (2000). Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13175-13178.

Zdychova, J., & Komers, R. (2005). Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res*, 54(1), 1-16.

Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103-123.

Tezze, C., Romanello, V., & Sandri, M. (2019). FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, 10, 419.

Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M. A., Fadini, G. P., Albiero, M., Favaro, G., ... & Loeffler, S. (2017). Age-associated loss of OPA1 in muscle impacts muscle mass, metabolic homeostasis, systemic inflammation, and epithelial senescence. *Cell metabolism*, 25(6), 1374-1389.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., ... & Törnelli, J. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429(6990), 417.

Trinh, I., & Boulianne, G. L. (2013). Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. *Physiology*, 28(2), 117-124.

Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(2), 113-128.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.

Tymoczko, J. L., Berg, J. M., & Stryer, L. (2011). *Biochemistry: a short course*. Macmillan.

Tyynismaa, H., Carroll, C. J., Raimundo, N., Ahola-Erkkilä, S., Wenz, T., Ruhanen, H., ... & Orešič, M. (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Human molecular genetics*, 19(20), 3948-3958.

Tyynismaa, H., Mjosund, K. P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., ... & Suomalainen, A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), 17687-17692.

Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J., & Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics*, 28(3), 211.

Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 359-407.

Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*, 324(5930), 1076-1080.

Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(10), 1833-1838.

Wu, S. B., Ma, Y. S., Wu, Y. T., Chen, Y. C., & Wei, Y. H. (2010). Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Molecular neurobiology*, 41(2-3), 256-266.

Xie, Z., Dai, J., Dai, L., Tan, M., Cheng, Z., Wu, Y., ... & Zhao, Y. (2012). Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(5), 100-107.

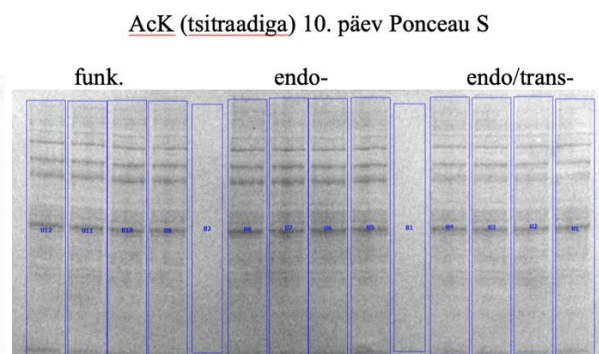
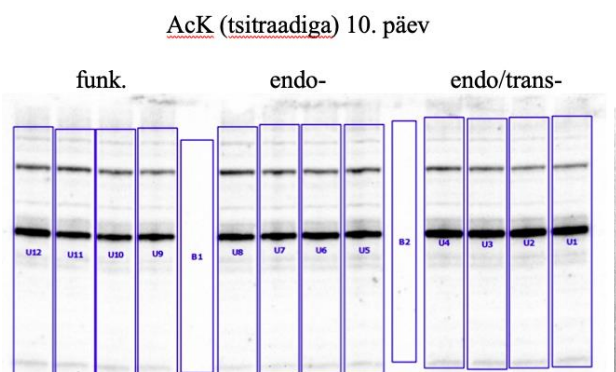
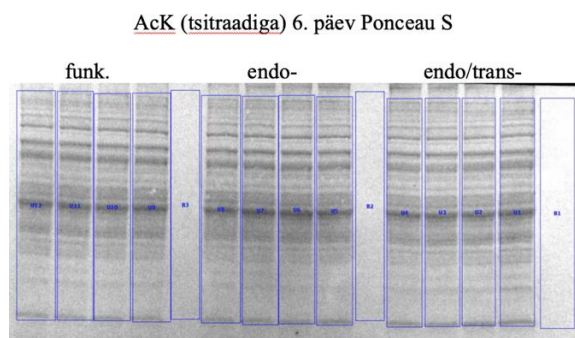
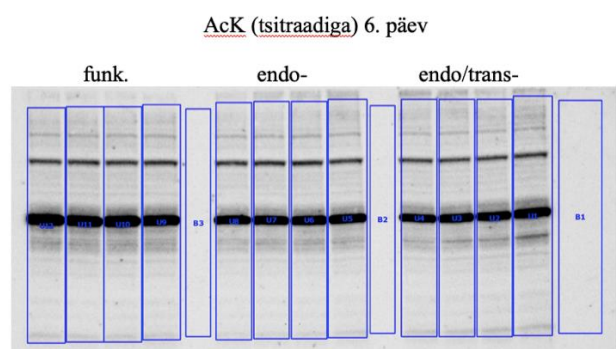
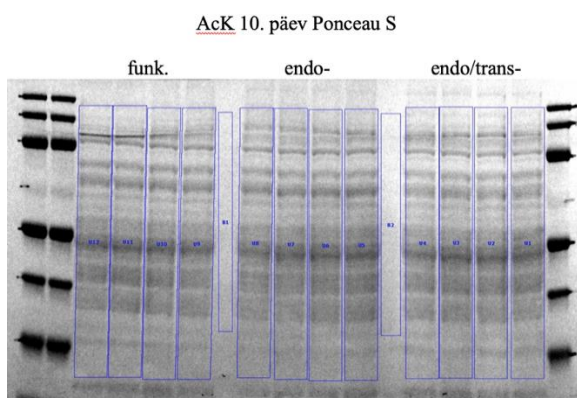
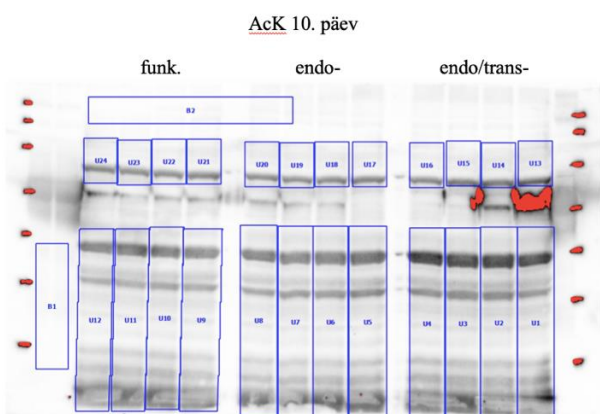
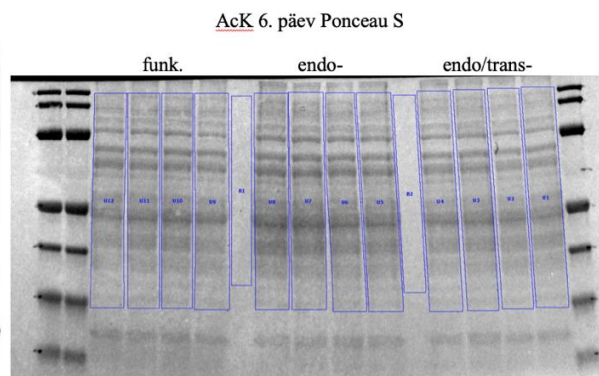
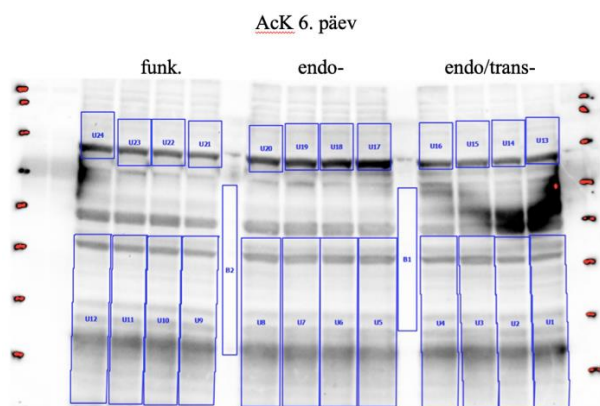
Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P. S., Fan, J., Rabinowitz, J. D., & Thompson, C. B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18), 6904-6909.

Youle, R. J., & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065.

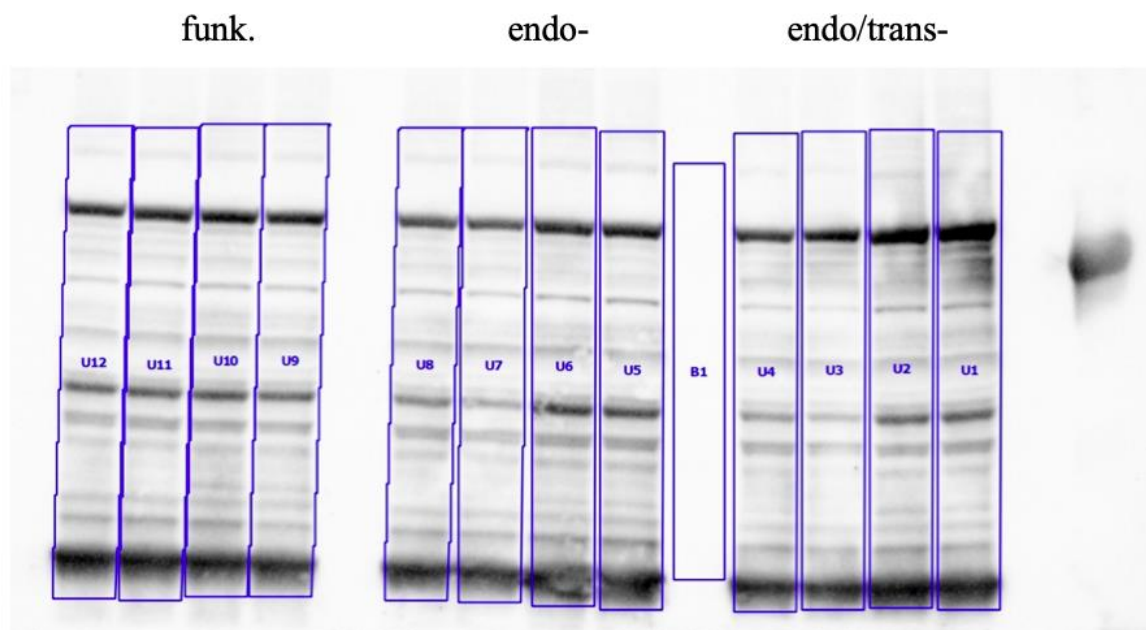
## LISAD

### Lisa 1. Antikehadega märgitud ja Ponceau S-ga värvitud membraanide pildid 6. ja 10. päeval.

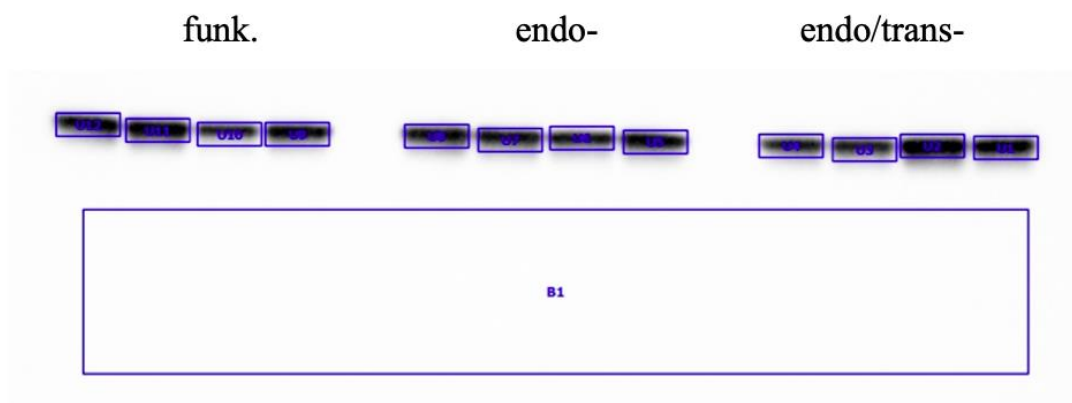
Pilte kasutati üldise, H3 ja mitokondriaalse atsetülatsiooni signaali kvantifitseerimiseks (sinised kastid on alad kvantifitseerimiseks).



**Lisa 2. Mito atsetülatsiooni membraani pilt 10. päeval. Sinised kastid on alad kvantifitseerimiseks.**



**Lisa 3. NDUF33 membraani pilt 10. päeval. Sinised kastid on alad kvantifitseerimiseks.**



## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Diana Bahhir

(sünnikuupäev 26.11.1994),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Mitokondriaalse DNA stress põhjustab metabolismi muutusi *Drosophila melanogaster*'is läbi valkude atsetülatsiooni defekti,

mille juhendaja on Priit Jõers,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Diana Bahhir

28.05.19